

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Citocompatibilidad de tejidos cardiacos humanos decelularizados con
detergentes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Ángeles Espinosa Castro

Directores

María Eugenia Fernández Santos

Pedro Luis Sánchez Fernández

Francisco Fernández-Avilés

Madrid, 2017



Universidad Complutense de Madrid

FACULTAD DE MEDICINA

Tesis Doctoral

**CITOCOMPATIBILIDAD DE TEJIDOS CARDIACOS
HUMANOS DECELULARIZADOS CON DETERGENTES**

María Ángeles Espinosa Castro

Madrid, 2015

Universidad Complutense de Madrid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



Tesis Doctoral

**CITOCOMPATIBILIDAD DE TEJIDOS CARDIACOS
HUMANOS DECELULARIZADOS CON DETERGENTES**

María Ángeles Espinosa Castro

Directores:

Dra. María Eugenia Fernández

Dr. Pedro Luis Sánchez

Prof.Dr. Francisco Fernández –Avilés

Madrid, 2015

Doña María Eugenia Fernández, Directora Técnica de la Unidad de Producción Celular y Medicina Regenerativa perteneciente al Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Don Pedro Luis Sánchez, Profesor Asociado de la Universidad de Salamanca y Don Francisco Fernández-Avilés, Catedrático de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN

Que Doña María Ángeles Espinosa Castro, Licenciada en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado *“Citocompatibilidad de tejidos cardíacos humanos decelularizados con detergentes”* que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Y para que conste, firmamos la presente a 22 de Octubre de 2015

Dra. M.Eugenia Fernández

Dr. Pedro L.Sánchez

Prof.Dr. Francisco Fdez-Avilés

A mis padres

Agradecimientos

Concebir este trabajo sin el esfuerzo y la ilusión de un gran equipo humano es imposible. Me gustaría agradecer a todos mis compañeros su dedicación y entusiasmo para llevar a cabo un proyecto fascinante que tantas horas de sueño nos ha robado a muchos. Somos un gran equipo multidisciplinar y no quisiera olvidarme de nadie: Doris Taylor, Stefan M. Kren, Candelas Pérez del Villar, Salvatore Costanza, Andreu M. Climent, Hugo Rodríguez, Gregorio Garrido, Isabel Moscoso, M. Ángeles González, Ricardo Sanz, Jose L. Escalante, Javier Menárquez, María S. Guillén, Javier Bermejo, Raquel Yotti, Antonio Bernad, James T. Willerson, Alicia Barrios, Julio García, Judith R. Acebes, Jesús Romero, Susana Suárez, Pilar Velasco, Virginia Plasencia y Ana Fernández Baza.

Muy especialmente a mis tres Directores de Tesis Doctoral; al Profesor Francisco Fernández- Avilés, a la Dra. María Eugenia Fernández y al Dr. Pedro Luis Sánchez por hacerme ver que siempre se puede llegar a la meta si realmente te lo propones.

A la Organización Nacional de Trasplante, por su disposición y colaboración; y sobre todo, a los familiares de cada una de las personas donantes porque sin su generosidad y altruismo este trabajo nunca hubiera sido posible.

A mis padres, por tantos años de esfuerzo y sacrificio.

Y a Javi, porque este trabajo es tan tuyo como mío.

Resumen

La insuficiencia cardíaca (IC) es una patología de mal pronóstico muy prevalente en todo el mundo, con más de 20 millones de afectados a nivel global, estimándose que aproximadamente el 50% de los pacientes habrán fallecido en los siguientes 5 años tras el diagnóstico. El trasplante cardíaco (TC) es el tratamiento definitivo en la fase final de la enfermedad pero su aplicación está limitada por la escasez de donantes. Los dispositivos de asistencia ventricular son una alternativa al TC pero tampoco están exentos de complicaciones. El diseño de tejidos bioartificiales que puedan reparar o sustituir miocardio dañado es una opción terapéutica teórica en estos pacientes.

En el año 2008 Ott y Taylor demostraron que es posible obtener una matriz extracelular tridimensional decelularizada (MECd) de un corazón completo de rata mediante la perfusión anterógrada de detergentes a través del sistema vascular del órgano. La matriz acelular resultante conserva la estructura tridimensional así como los componentes extracelulares del órgano. Otros investigadores han reproducido estos resultados en varios modelos murinos y de cerdo.

Con estos precedentes formulamos la hipótesis de que la decelularización con detergentes iónicos (Dodecil Sulfato de Sodio, SDS) aplicada a tejidos cardíacos humanos permite crear matrices extracelulares decelularizadas que constituyen un armazón tridimensional, perfundible y citocompatible donde es posible la supervivencia y ordenación de células maduras y la supervivencia, ordenación y maduración de células progenitoras. Los objetivos de este trabajo han sido:

1. Obtener una matriz extracelular a partir de un corazón humano cadáver no apto para trasplante que tenga una geometría tridimensional y un árbol vascular intacto y análogo al del corazón original mediante la perfusión de un detergente iónico (SDS).
2. Caracterizar histológicamente el grado de eliminación celular y cuantificar la presencia de ADN residual en la MECd obtenida en comparación con corazones cadáver control.
3. Estudiar las propiedades mecánicas pasivas de la matriz mediante el análisis de la relación presión-volumen.

4. Comprobar la supervivencia y estudiar la ordenación de células progenitoras (células mesenquimales de médula ósea humana, hBMSC, y células progenitoras cardíacas, hCPC) y de células diferenciadas (células endoteliales de vena umbilical, HUVEC, y cardiomiocitos HL-1 y H9c2) sembradas y cultivadas en dos estructuras cardíacas humanas decelularizadas: parches de ventrículo izquierdo y válvula aórtica.
5. Analizar, mediante la cuantificación de la expresión de genes cardíacos, la influencia de la matriz en la diferenciación de células progenitoras cardíacas, (hCPC).
6. Estudiar el acoplamiento eléctrico de los cardiomiocitos y de las células progenitoras (hBMSC y hCPC) en la matriz.

Para el presente estudio hemos decelularizado 39 corazones humanos procedentes de donantes cadáver que la ONT consideró no válidos para trasplante entre mayo de 2010 y junio de 2013. Por vía anterógrada aórtica perfundimos a las arterias coronarias SDS 1% durante un período comprendido entre 4 y 8 días. Analizamos la estructura macroscópica e histología de los corazones decelularizados y el árbol coronario, cuantificamos la concentración de ADN residual en las matrices y estudiamos la funcionalidad del sistema vascular y las propiedades mecánicas pasivas de la matriz. Trece corazones no se decelularizaron y sirvieron como controles cadáver. Para valorar la citocompatibilidad, sembramos y cultivamos células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC), cardiomiocitos H9c2, cardiomiocitos HL-1, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana (hBMSC) y células progenitoras cardíacas humanas c kit + (hCPCs) en parches de ventrículo izquierdo decelularizado; también sembramos células HUVEC y hBMSCs en válvulas aórticas decelularizadas. Para analizar el posible efecto de la MECd sobre la diferenciación de las hCPCs estudiamos la expresión de varios genes y factores de transcripción cardíacos a los 21 días de cultivo, comparándolo con la expresión génica en cultivos de gelatina convencionales. Finalmente se analizó la presencia de actividad eléctrica en cardiomiocitos H9c2, HL-1, hBMSC y hCPCs mediante técnicas de mapeo óptico.

Los corazones se decelularizaron en unos 4 días obteniendo macroscópicamente una matriz de aspecto traslúcido que mantenía la forma del corazón y aproximadamente el 85% de la masa original del órgano. Antes de disecar el corazón, se comprobó la conservación de la estructura macroscópica interna y la funcionalidad de los vasos epicárdicos y del lecho vascular miocárdico. La perfusión de líquido hemático en el tronco coronario izquierdo permitió observar a simple vista flujo epicárdico demostrando que la matriz es capaz de retener sangre en el espacio intravascular. La histología confirmó la pérdida de los

componentes celulares incluyendo núcleos y componentes citoplasmáticos de la matriz y del sistema vascular. La cantidad de ADN residual fue inferior al 5%, con una media de 34 ± 29 ng vs 413 ± 262 ng en los corazones control ($p < 0.001$). En todas las muestras analizadas representativas de distintas estructuras cardíacas observamos < 50 ng de dsDNA por mg de tejido húmedo. Los análisis histológicos y ultraestructurales con microscopía electrónica confirmaron la preservación y orientación de las fibras miocárdicas en la matriz. Las propiedades pasivas mecánicas medida con curvas pasivas de presión-volumen pre y post decelularización mostraron la característica curva exponencial. Se observó una mayor complianza en el ventrículo izquierdo (VI) y ventrículo derecho (VD) de las matrices, (relación dP/dV pre y post decelularización para el VI: $0,84$ (95% IC: $0,55-1,13$) vs $0,12$ ($0-0,41$) mmHg/ml $p < 0,001$; para el VD $0,27$ (95% IC: $0,14-0,4$) vs $0,12$ ($0-0,25$) $p < 0,01$).

En los cultivos de válvula aórtica el comportamiento observado de las HUVECs y hBMSCs fue muy similar. Al 6º día de cultivo se observó una fina monocapa de células en la cara valvular depositadas sobre la lámina endotelial y algunas células en la cara ventricular. Sobre parches de miocardio a las 24 horas de sembrado, tanto las células hBMSC como las células hCPC se habían dispersado y depositado sobre la superficie de la matriz. A las 48 horas observamos que las células hBMSC habían aumentado de tamaño y comenzaban a infiltrar la MECd. A los 21 días habían infiltrado la matriz siendo evidente su aumento de tamaño aunque la alineación era incompleta. Las células hCPC presentaron un comportamiento diferente, la infiltración de la matriz fue muy escasa y no había cambios en cuanto a su aspecto o alineación. Las células HUVEC migraron para localizarse fundamentalmente en torno a los vasos sanguíneos más grandes en el interior de la matriz y en la superficie endocárdica de la misma. Los cardiomiocitos H9c2 y HL1 se adherían a la matriz en las primeras 24 horas y comenzaban ya a alinearse. En los días siguientes se observaba una organización progresiva y aumento de tamaño y en el día 21 estaban organizadas en lo que parecían islotes musculares rodeados de matriz. Las únicas células madre que mostraron una tendencia similar a organizarse de este modo fueron las células hBMSC, que comenzaron a organizarse en el día 21. El crecimiento de células hCPC en parches de matriz de VI y VD promovió mayor regulación de Nkx2.5, TnnT y MYH7 en comparación con las células en el cultivo de gelatina. La expresión de genes cardíacos fue mayor en las células cultivadas en parches de VI que en los parches de VD. Los cardiomiocitos H9c2 y HL-1 que parecían haberse organizado en fibras similares a las musculares, expresaban conexina 43 *in vitro*, eran capaces de propagar potenciales de acción y mostraron corrientes de calcio transitorias en respuesta a estimulación eléctrica. Las células progenitoras hCPC y hBMSC, sin embargo, que no se habían

organizado completamente en la matriz, no generaron corrientes de calcio ni propagaron señales eléctricas.

A la vista de estos resultados, podemos concluir que es factible eliminar las células de un corazón adulto humano mediante la perfusión de detergentes iónicos (SDS) dando lugar a una matriz tridimensional acelular. Esta matriz mantiene la estructura macroscópica, la ultraestructura y una composición muy similar a la matriz extracelular nativa cardíaca. Por otro lado, los vasos epicárdicos y la microcirculación coronaria se mantienen impermeables después del proceso de decelularización. La matriz extracelular cardíaca humana es una estructura que permite la adhesión y viabilidad de las células endoteliales y cardiomiocitos diferenciados así como la de las células progenitoras utilizadas en este estudio. La ordenación de cardiomiocitos a modo de fibras musculares en el seno de la matriz, así como la expresión de conexina 43 y la observación de acoplamiento eléctrico intercelular y el alineamiento de las células endoteliales alrededor de los vasos, confirma la capacidad que tiene la matriz tridimensional cardíaca humana para dirigir y modular el comportamiento de las células diferenciadas en su interior. Por otro lado, el aumento de la expresión génica de factores de transcripción cardíacos y proteínas sarcoméricas por parte de las hCPCs cuando son cultivadas en la matriz frente a las mismas células en cultivos convencionales, confirma la capacidad de la matriz para inducir diferenciación en células progenitoras.

Summary

Heart failure (HF) syndrome is a common cardiac condition, with more than twenty million people affected worldwide. Despite improvements in medical and device therapy, the prognosis remains poor, and cardiac transplantation is considered the definite treatment for end-stage HF though this therapy is actually limited by donor availability and immunorejection. A possible solution is the development of engineered cardiac tissue that can replace damaged myocardium or induce endogenous cardiac repair.

In 2008 Ott and Taylor's group showed that a tridimensional whole - heart matrix scaffold could be generated by removing all cells from a murine's heart. For that purpose they carried out antegrade coronary perfusion with detergents. The acellular scaffold had intact chamber geometry and perfusable vascular architecture. These constructs were resseeded with cardiac and endothelial cells. Other investigators have reproduced these results in several murine models and pig hearts.

We hypothesized that a decellularization protocol with detergents in human cardiac tissues might produce a decellularized three-dimensional and perfusable extracellular scaffold that can be reseeded with cells. Survival and alignment of endothelial cells, cardiomyocytes and stem cells is possible within the heart human matrix. The extracellular matrix also enhances stem cell differentiation.

For that purpose we have decellularized 39 cadaveric human hearts with sodium-dodecyl-sulfate (SDS) for 4-8 days. The hearts were perfused via antegrade flow through the ascending aorta. Cell removal and architectural integrity were determined anatomically, functionally, and histologically. To assess cytocompatibility, we cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), H9c2 and HL-1 cardiomyocytes, human cardiac-progenitor cells (hCPC), and human bone-marrow mesenchymal cells (hBMSCs) in vitro on decellularised ventricles up to 21 days. We also cultured HUVEC cells and hBMSCs on decellularised aortic valves up to 6 days. Cell survival, alignment and organization were analysed both in ventricles and aortic valves. Gene expression and electrical coupling were analysed in recellularised ventricles and compared to conventional 2-dimensional cultures.

Decellularization removed cells but preserved the three-dimensional cardiac macro and microstructure and the native vascular network in a perfusable state. Cell survival was

observed on decellularised ventricles and aortic valves for 21 days and 6 days respectively. On ventricles, hCPCs expressed cardiomyocyte genes though did not adopt cardiomyocyte morphology or organization; HUVECs formed a lining of endocardium and vasculature; this was also observed with HUVECs and hBMMSCs on aortic valve. On ventricle, H9c2 and HL-1 cardiomyocytes organized into nascent muscle bundles and displayed mature calcium dynamics and electrical coupling.

In conclusion, we have shown that decellularization of human hearts is feasible and provides a cytocompatible scaffold that retains three- dimensional architecture and vascularity. This acellular matrix can be recellularized with parenchymal and vascular cells. Differentiated cells organize and show electrical coupling. The acellular scaffold promotes cardiomyocyte gene expression in cardiac progenitor cells. We believe that evidence from human cardiac whole scaffolds should be translated to xenogenic decellularised constructs for clinical applicability.

Abreviaturas

5-AZT	5-azacitidina
AA	Aorta ascendente
AB	Arteria braquiocefálica
AD	Aurícula derecha
ADNc	ADN complementario
AETII	Células del epitelio alveolar tipo 2
AI	Aurícula izquierda
AP	Arteria pulmonar
ARNm	ARN mensajero
ASCs	Células madre derivadas del tejido adiposo
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
BMMNCs	Células mononucleadas derivadas de la médula ósea
BMP	Proteína morfogenética ósea
BMP-4	Proteína morfogenética ósea 4
BMSCs	Células mesenquimales derivadas de médula ósea
bp	Pares de bases
BT	Bioingeniería Tisular
CHAPS	3-[(3-colamidopropilo) dimetilamonio]-1-propano
CO₂	Dióxido de Carbono
CPHs	Células precursoras hematopoyéticas
DA	Arteria descendente anterior
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
Dil	Octadecilo (C ₁₈)-indocarbocianina
DKK1	Proteína Dickkopf tipo 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
dP/dV	Derivada de la presión ventricular con respecto al volumen (rigidez)
dsDNA	ADN de doble cadena
ECGS	Endothelial cell growth supplement
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
EGTA	Ácido etileno glicol tetraacético

EPC	Células precursoras endoteliales
ESCs	Células madre embrionarias
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAG	Glucosaminoglicanos
GCSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas
H&E	Hematoxilina-eosina
hAFSCs	Células madre de líquido amniótico humano
hBMSCs	Células mesenquimales de médula ósea de origen humano
hCPCs	Células residentes progenitoras cardíacas humanas
hESC	Células madre embrionarias de origen humano
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HLA-I	Antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I
HLA-II	Antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
HUVEC	Células endoteliales humanas de vena umbilical
IC	Insuficiencia cardíaca
IL-10	Interleukina 10
IL-6	Interleukina 6
iPS	Célula pluripotente inducida
iPSC-MSCs	Células mesenquimales derivadas de células iPS
ITS	Insulina-transferrina-selenio
MAPCs	Células progenitoras multipotentes adultas
MEC	Matriz extracelular
MECd	Matriz extracelular decelularizada
MEF2C	Factor potenciador de miocitos 2C
MIAMI	Células inducibles de multilineaje adultas aisladas de médula ósea
MO	Médula ósea
MP	Músculo papilar
MSCs	Células mesenquimales
MYH6	Cadena pesada de miosina α
MYL2	Cadena ligera de miosina 2
MYL7	Cadena ligera de miosina 7
NAN₃	Acida de sodio
NE	Norepinefrina

NK	Células natural killer
OCI	Ostium coronario izquierdo
OCT	Tomografía óptica coherente
ONT	Organización nacional de trasplantes
PBS	Solución buffer fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA	Paraformaldehído
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PS	Penicilina-streptomina
PV	Relación pasiva presión-volumen
RAEC	Células endoteliales aórticas de rata
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SIVd	Septo interventricular derecho
SIVi	Septo interventricular izquierdo
SVF	Fracción estromal vascular
TC	Trasplante cardíaco
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TGFβ1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TNNT2	Gen de la Troponina Cardíaca T
VAO	Válvula aórtica
VCI	Vena cava inferior
VD	Ventrículo derecho
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VI	Ventrículo izquierdo
VM	Válvula mitral
VP	Válvula pulmonar
VSELs	Células madre muy pequeñas similar a embrionarias
VT	Válvula tricúspide
βMHC	Gen de la cadena pesada de la beta miosina

Índice general

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca y trasplante cardíaco	2
1.2. El camino hacia la creación de un órgano bioartificial.....	4
1.2.1. El concepto de matriz extracelular biológica.....	5
1.2.2. El proceso de decelularización.....	7
1.2.2.1. Agentes químicos empleados.....	8
1.2.2.2. Agentes biológicos utilizados.....	10
1.2.2.3. Criterios de decelularización de la matriz.....	11
1.2.3. Células candidatas para recelularizar el parénquima de la matriz.....	11
1.2.3.1. Células parenquimatosas adultas	12
1.2.3.2. Células madre	12
1.2.3.2.a. Células madre embrionarias.....	13
1.2.3.2.b. Células madre fetales.....	13
1.2.3.2.c. Células madre adultas.....	14
1.2.3.3. Células pluripotentes inducidas.....	20
1.2.3.4. Células de soporte.....	21
1.2.4. Tipos celulares utilizados para recelularización vascular.....	21
1.2.5. Métodos de recelularización.....	22
1.2.5.1. Sembrado celular.....	22
1.2.5.2. Cultivo de la matriz. Biorreactores.....	24
1.2.5.2.a. Parámetros de cultivo celular.....	24
1.2.5.2.b. Estímulos biofísicos.....	25

1.3. Bioingeniería tisular aplicada a tejidos cardíacos.....	26
1.3.1. Matrices extracelulares cardíacas decelularizadas. Inicios.....	27
1.3.2. Protocolos de decelularización en modelos de corazón murino.....	28
1.3.3. Protocolos de decelularización en modelos de corazón de cerdo.....	29
1.3.4. Estrategias de recelularización en matrices cardíacas.....	30
1.3.4.1. Tipos celulares utilizados.....	31
1.3.4.2. Métodos de sembrado celular.....	35
1.3.4.3. Optimización del cultivo.....	36
1.3.4.3.a. Factores de crecimiento y diferenciación.....	36
1.3.4.3.b. Biorreactores.....	36
2. HIPÓTESIS.....	43
3. OBJETIVOS.....	45
4. MATERIAL Y METODOS.....	47
4.1. Obtención de corazones procedentes de donantes cadáver.....	48
4.2. Decelularización de corazones.....	48
4.2.1. Técnica de decelularización.....	48
4.2.2. Análisis de la estructura macroscópica de la matriz.....	50
4.2.3. Análisis histológico y estructural de la matriz.....	51
4.2.4. Cuantificación de ADN residual.....	52
4.2.5. Análisis de las propiedades pasivas mecánicas de la matriz.....	53
4.3. Citocompatibilidad en parches de ventrículo y válvula aórtica.....	54
4.3.1. Líneas celulares utilizadas.....	54
4.3.2. Recelularización de matrices de válvula aórtica.....	55

4.3.2. Recelularización de la matriz extracelular <i>in vitro</i>	57
4.3.4. Caracterización de la expresión génica en células c kit+ hCPC	57
4.3.4. Metodología del estudio de acoplamiento eléctrico celular.....	58
5. RESULTADOS.....	61
5.1. Valoración de la matriz cardíaca extracelular decelularizada.....	62
5.1.1. Integridad estructural macroscópica.....	62
5.1.2. Eliminación celular y conservación estructural de la matriz.....	66
5.1.3. Integridad funcional de la matriz.....	67
5.1.4. Integridad del sistema vascular.....	70
5.2. Resultados de citocompatibilidad.....	71
5.2.1. Distribución y alineamiento celular sobre válvula aórtica.....	71
5.2.2. Distribución y alineamiento celular en parches de miocardio.....	73
5.2.3. Efecto de la matriz en la diferenciación de células ckit+ hCPC.....	75
5.2.4 Actividad celular eléctrica.....	76
6. DISCUSIÓN.....	78
7. CONCLUSIONES.....	87
8. BIBLIOGRAFÍA.....	90
9. ANEXOS.....	105

1. Introducción

1.1. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca y trasplante cardíaco

La insuficiencia cardíaca (IC) es una patología muy prevalente en todo el mundo, estimándose en el momento actual más de 20 millones de personas en el mundo con esta enfermedad (1). La prevalencia de IC en pacientes mayores de 65 años alcanza el 10% y podría incrementarse hasta en un 46% en las próximas dos décadas en E.E.U.U. (2). En España, al igual que en otros países de nuestro entorno, supone un gran impacto sanitario. Es la primera causa de ingreso hospitalario en pacientes de más de 65 años y la cuarta causa de mortalidad por causa cardiovascular motivando el 10% de las muertes por causa circulatoria en varones y el 16% en mujeres (3).

La insuficiencia cardíaca es un síndrome clínico complejo que supone la fase final de muchas enfermedades cardiológicas. En los últimos años la aparición y la generalización del uso de fármacos eficaces para la IC con función sistólica deprimida (como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o betabloqueantes) ha permitido mejorar el pronóstico en este subgrupo de pacientes (3). Sin embargo, en la IC con función sistólica preservada, que supone ya más del 50% de los diagnósticos (4), todavía no existe ningún tratamiento que haya demostrado mejorar la supervivencia (5, 6). El pronóstico global de la enfermedad continúa siendo malo, estimándose que aproximadamente el 50% de los pacientes con IC habrán fallecido en los siguientes 5 años tras el diagnóstico (2).

La fase final de la enfermedad (insuficiencia cardíaca terminal) es la principal causa de muerte de los pacientes (7, 8). Desde que hace casi 50 años, en 1967, el Dr. C. Barnard realizó el primer trasplante cardíaco en un humano esta técnica se ha convertido en el tratamiento definitivo, pero su aplicación es limitada ya que no todos los pacientes en situación de IC terminal pueden beneficiarse de un trasplante. Aparte de las contraindicaciones que pueden presentar determinados pacientes y que los convierten en no candidatos, los potenciales receptores se enfrentan al problema de que los órganos disponibles son limitados.

España ha sido y sigue siendo un país pionero a nivel mundial en cuanto a donaciones y procedimientos desde que en nuestro país se comenzó a realizar trasplante cardíaco en el año 1984, habiéndose realizado hasta el momento actual más de 7.000 procedimientos (9). El Registro Español de Trasplante Cardíaco recoge en su último informe 248 trasplantes realizados en nuestro país en el año 2013, lo que supone 5,3 procedimientos por millón de población (p.m.p) situándonos en una posición privilegiada en relación con otros países de nuestro entorno. Esta cifra, sin embargo, ha sufrido un descenso progresivo en la última

década, desde el máximo de actividad registrada en el año 2000 con 8,9 trasplantes p.m.p realizados (10).

La tendencia en los últimos años en España es la de una reducción en el número de donantes con respecto a la década de los noventa. Su principal motivo en nuestro país parece ser el cambio epidemiológico del perfil de donante, con una reducción muy importante del número de donaciones en relación con traumatismo craneoencefálico por accidente de tráfico y un aumento de donaciones en relación con accidente cerebrovascular. Algunos datos reflejan ya esta situación. Así, en los últimos 5 años se ha observado un aumento claro del número de pacientes que continúan en lista cardíaca al final de cada año (9); (Figura 1). La probabilidad de trasplante, por otro lado, ha disminuido de manera muy significativa con respecto a la década de los 90. Si en los años 90 el porcentaje de pacientes trasplantados por año se situaba en torno al 70% del total de pacientes en lista de espera, en el año 2013 esta cifra fue del 56%, muy similar en los últimos 3-4 años (9); (Figura 2). En la actualidad la mediana del tiempo en lista de espera se sitúa en 85 días frente a los 53 días del año 2008. Hay que reseñar además que el trasplante cardíaco supone para los pacientes la necesidad de terapias de inmunosupresión crónica con la comorbilidad que ello conlleva.

Como posibles alternativas al trasplante ya con aplicación clínica se encuentran los dispositivos de asistencia ventricular definitivos pero estos dispositivos tampoco están exentos de complicaciones.

El diseño de tejidos bioartificiales que puedan reparar o sustituir miocardio dañado como opción terapéutica para pacientes con IC avanzada es una alternativa teórica tanto a la terapia de trasplante cardíaco como a los dispositivos de asistencia ventricular.

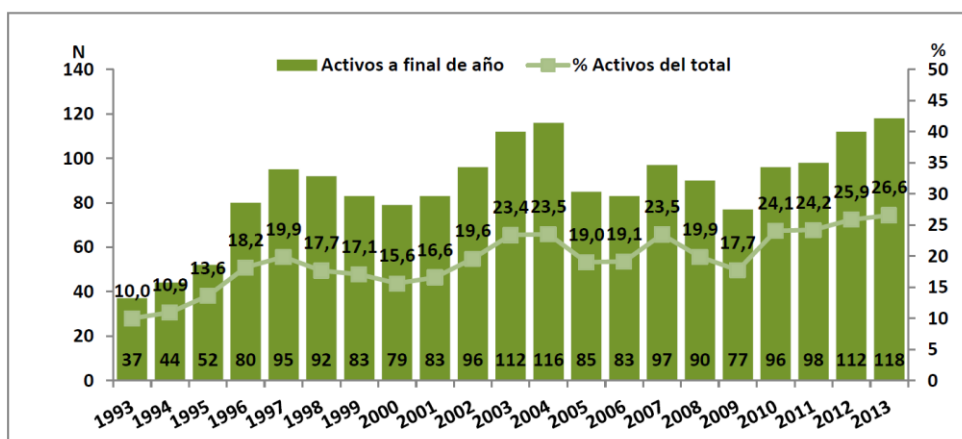


Figura 1. Evolución del número de pacientes en lista de espera cardíaca en España al final de cada año. Período 1993-2013. (Tomado de la memoria de actividad de trasplante cardíaco de la ONT 2013. <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20trasplante%20cardiaco%202013.pdf>)

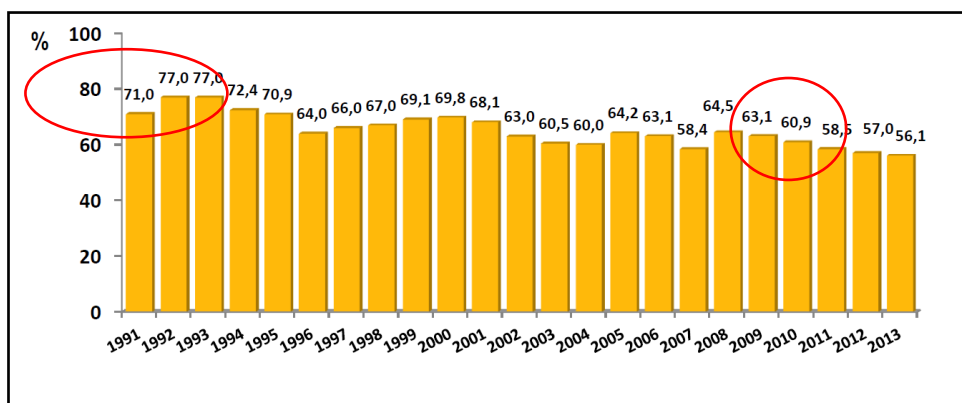


Figura 2. Evolución del porcentaje de pacientes trasplantados por año con respecto al total de pacientes en lista. Período 1991-2013. Se observa el descenso progresivo y estancamiento actual con respecto a la década de los 90. (Modificado de última memoria de actividad de trasplante cardíaco de la ONT, 2013. <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20trasplante%20cardiaco%202013.pdf>).

1.2. El camino hacia la creación de un órgano bioartificial

Desde la década de los 90 se ha producido un gran desarrollo en el diseño de tejidos biológicos que puedan sustituir o reparar tejidos u órganos lesionados. La Bioingeniería Tisular (BT) se estableció oficialmente como disciplina en la conferencia de Tahoe en el año 1988. Este término alude a “la aplicación de los principios y métodos de ingeniería y de ciencias de la salud para la comprensión de la relación entre estructura y función de tejidos de mamíferos sanos y patológicos y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función tisular” (11). Desde el nacimiento de la disciplina se han logrado avances muy importantes en medicina regenerativa.

El diseño de tejidos bioartificiales es un proceso muy complejo y diferente para cada tejido pero en esencia en todos los casos es necesario disponer de un almacén o matriz que sirva de soporte y sobre el mismo implantar células que tengan la capacidad de sobrevivir, ordenarse y desarrollar las funciones propias del tejido dentro de la matriz.

Se ha conseguido con éxito diseñar tejidos bioartificiales como vasos sanguíneos (12-17), piel (18), submucosa intestinal (19-21), vejiga (22-25), tráquea (26, 27) y válvulas cardíacas (28-33). Todos ellos tienen en común que no necesitan una anastomosis directa con la circulación del receptor para su aplicación clínica. Estos tejidos se conciben como una matriz en dos dimensiones, donde las células implantadas se nutren y reciben oxígeno por difusión mientras se va desarrollado un sistema vascular. Sin embargo, el diseño de órganos bioartificiales más complejos no ha sido posible durante muchos años por la dificultad para diseñar un almacén o matriz tridimensional que diera soporte a las células. Esta situación cambió radicalmente en el año 2008, cuando Ott y Taylor demostraron que es posible obtener una matriz tridimensional a partir de un corazón cadáver de murino si se eliminan previamente sus componentes celulares a través de la perfusión de determinados agentes por el propio sistema vascular del órgano (34). Desde entonces, la aplicación y optimización de la técnica de decelularización por perfusión en distintos órganos ha permitido crear matrices biológicas de corazón (34-44), pulmón (45-66), hígado (67-82), páncreas (83, 84) y riñón (85-94) en distintos modelos animales y en algunos casos sobre tejidos humanos.

1.2.1 El concepto de matriz extracelular biológica

Desde el punto de vista de la bioingeniería tisular podemos considerar dos tipos de matrices o armazones que sirven de soporte para la regeneración de tejidos biológicos:

1. Matrices diseñadas a partir de una estructura o almacén sintético reabsorbible sobre el que se implantan diferentes líneas celulares.
2. Matrices biológicas obtenidas a partir de tejidos u órganos en los que se eliminan previamente todas las células mediante un proceso de decelularización. (Matrices extracelulares decelularizadas, MECd).

El diseño de órganos bioartificiales completos requiere una MECd tridimensional que debe anastomosarse a la circulación del donante para su funcionamiento. La decelularización de un órgano completo alogénico o xenogénico permite obtener una estructura biológica tridimensional acelular que sirve como almacén para implantar células adultas o progenitoras.

Varios estudios preclínicos con modelos animales han demostrado que la presencia de células en el seno de estas matrices biológicas dan lugar a la formación de tejido funcional (48, 67).

Los mecanismos por los cuales la MECd promueve la regeneración de tejido funcional no están del todo aclarados, si bien parece existir una **“reciprocidad dinámica”** entre la MECd y la población celular residente en ella (95). Este concepto se refiere al fenómeno observado de que la estructura y composición de la MECd están en constante cambio en respuesta a la actividad de las células implantadas en ella, a las demandas mecánicas del tejido y a las condiciones predominantes del microambiente de la matriz.

Todas las MECd bioartificiales están compuestas esencialmente por diferentes tipo de colágeno, glicosaminoglicanos (GAG), fibronectina, laminina, elastina y factores de crecimiento. La degradación de muchos de estos compuestos nativos da lugar a la liberación de moléculas peptídicas solubles que están implicadas en la regulación de muchas actividades biológicas del órgano como procesos de proliferación, migración, diferenciación celular y angiogénesis (96-98). Por otro lado, la organización ultraestructural de la matriz modula el comportamiento de las células implantadas, regulando su migración, su fijación en determinadas localizaciones e influyendo sobre la diferenciación fenotípica en función del tejido (46, 48, 99-101). Es decir, en el crecimiento y diferenciación de las células en el almacén bioartificial son fundamentales tanto la composición de la MECd como su organización espacial tridimensional, específica del órgano origen, aunque sigue sin estar claro cuál de los dos factores es más importante (102).

El fenómeno de reciprocidad dinámica entre matriz y células residentes justifica que los almacenes biológicos decelularizados parezcan estructuras más apropiadas para la regeneración tisular de un órgano completo que los materiales sintéticos. También justifica la importancia que tiene mantener tanto la composición nativa como la ultraestructura y estructura macroscópica tridimensional del órgano en el proceso de preparación de la MECd, ya que todos los factores proporcionan el microambiente necesario para la fijación, proliferación y diferenciación celular, además de dar soporte mecánico a las células residentes.

1.2.2. El proceso de decelularización

La decelularización es el procedimiento que permite eliminar todas las células de un órgano con la máxima preservación posible de la composición nativa, la actividad biológica y la integridad mecánica de la MECd tridimensional resultante. Durante el proceso de decelularización las células son lisadas y se rompen las adhesiones que las mantienen unidas a la matriz extracelular. Los lípidos, azúcares, proteínas solubles y ADN celular son eliminados. En este proceso es muy importante eliminar todos los epítomos antigénicos asociados con membranas celulares y con los componentes intracelulares de los órganos y tejidos para evitar una respuesta inmunológica adversa en el receptor. Las proteínas que constituyen la MECd permanecen, así como muchas moléculas que actúan como señal para guiar la regeneración tisular posteriormente. Estas proteínas están altamente conservadas entre especies y son bien toleradas incluso por receptores xenogénicos (102).

En un órgano tridimensional el proceso de decelularización se lleva a cabo mediante la perfusión de agentes químicos y/o biológicos (proteasas y otros agentes no enzimáticos) a través del sistema vascular nativo del órgano. La técnica de perfusión se combina con métodos físicos como la agitación mecánica, la congelación y descongelación o la sonicación. Estas técnicas físicas permiten romper las membranas celulares y liberar el contenido intracelular facilitando así su eliminación. Es habitual combinar varios métodos físicos y agentes entre sí para optimizar la eficiencia del proceso para cada tejido y órgano. Los detergentes son posteriormente eliminados mediante múltiple lavados. Finalmente se esteriliza la matriz resultante antes del proceso de recelularización.

Es importante reseñar que cualquier método de decelularización va a alterar en algún grado la composición de la MECd y va a ocasionar cierto grado de disrupción de su ultraestructura (103). Aunque numerosos trabajos han demostrado que la técnica en general preserva los principales componentes de la matriz extracelular (MEC), también se ha observado con algunos protocolos una reducción significativa de ciertas proteínas de la MECd resultante y de factores de crecimiento en modelos de corazón (37), pulmón (55, 104), hígado o riñón (94). Minimizar estos efectos a la vez que se logra eliminar las células residentes es el objetivo del proceso de decelularización. El tiempo para lograr la eliminación de las células de un órgano es variable y puede oscilar desde aproximadamente unas horas hasta incluso varias semanas. La figura 3 muestra a modo de ejemplo algunos de los protocolos utilizados para diferentes órganos.

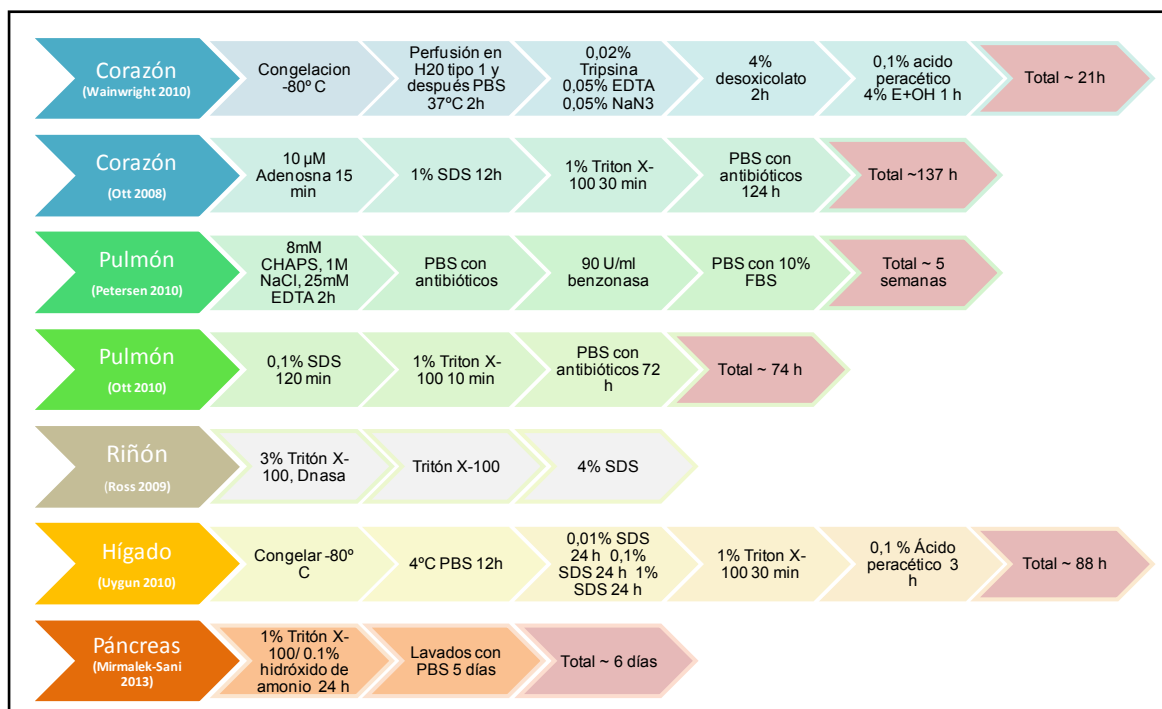


Figura 3. Algunos de los primeros protocolos de decelularización publicados para corazón, hígado, pulmón, páncreas y riñón. (Modificado de Badylak et al) Abreviaturas: PBS= solución buffer fosfato. SDS = Dodecil Sulfato de Sodio. EDTA =ácido etileno diaminotetraacético FBS = suero fetal bovino

1.2.2.1 Agentes químicos empleados

Destaca el empleo de distintos ácidos y bases, soluciones hipo e hipertónicas y distintos tipos de detergentes.

Los **ácidos y bases** producen degradación hidrolítica de moléculas. Son buenos agentes decelularizantes ya que solubilizan el componente citoplasmático de las células, producen disrupción de los ácidos nucleicos y desnaturalización de las proteínas. Sin embargo, a nivel de la matriz, pueden dañar y/o eliminar el colágeno (con la consiguiente reducción de la resistencia de la MECd). También pueden afectar a los GAGs y eliminar factores de crecimiento. De todos ellos, el ácido peracético es uno de los más utilizados ya que elimina los residuos de ácidos nucleicos ocasionando mínima afectación de la composición y estructura de la MECd (105, 106).

Las **soluciones hipertónicas** disocian las moléculas de ADN de las proteínas al romper sus interacciones (107). Las **soluciones hipotónicas** producen lisis celular por efecto osmótico con cambios mínimos en la composición y arquitectura de la MECd (108). Para un máximo efecto osmótico, los tejidos pueden sumergirse en soluciones hiper e hipotónicas alternativamente a

lo largo de varios ciclos. Estas soluciones también ayudan a lavar los tejidos de residuos celulares una vez producida la lisis celular.

Los **detergentes** iónicos, no iónicos y zwitteriónicos solubilizan las membranas celulares y disocian el ADN de las proteínas siendo por tanto muy efectivos en eliminar el material celular del tejido (107, 109), pero también rompen y disocian proteínas de la matriz. La eliminación de ADN y de proteínas de la matriz con detergentes es tiempo-dependiente (18, 110, 111) y varía en función del tipo de órgano y de la edad del donante (87, 112, 113). La combinación de varios tipos de detergentes en el proceso aumenta la pérdida de proteínas de la MECd pero también facilita su posterior eliminación una vez completado el proceso de decelularización (114, 115). Entre los más utilizados se encuentran el **Tritón X-100** y el **Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)**.

El Tritón X-100 es un detergente no iónico eficaz en la eliminación celular de tejidos gruesos como conductos valvulares donde otros productos como agentes osmóticos o enzimas son insuficientes (116). Esto lleva asociado la pérdida de proteínas de la matriz y la consiguiente disminución de respuesta inmunológica adversa in vivo. Los detergentes no iónicos son más eficaces en la delipidación de los tejidos que los no iónicos.

El deoxicolato sódico y el SDS son detergentes iónicos. SDS es más eficaz que el Tritón X-100 en la eliminación celular en los tejidos más densos y órganos tridimensionales completos (87, 111, 117, 118). Sin embargo, ello también lleva asociado mayor grado de disrupción de la ultraestructura de la MECd (31, 45, 119-121) y posible pérdida de factores de crecimiento (122).

El **detergente zwitteriónico 3-[(3-colamidopropilo) dimetilamonio]-1-propano (CHAPS)** es muy eficaz en la decelularización de tejidos finos como pulmón (46) pero es insuficiente para tejidos más gruesos, incluso en combinación con otros agentes como SDS (123). Independientemente del tipo de detergente utilizado, es muy importante eliminar cualquier residuo del mismo tras el proceso de decelularización mediante múltiples lavados, ya que incluso muy pequeñas concentraciones residuales de estos agentes pueden ser citotóxicas (115, 124).

1.2.2.2 Agentes biológicos utilizados

En los protocolos de decelularización se utilizan también distintas **enzimas** como nucleasas, tripsina, lipasa, collagenasa, dispasa, termolisina y α -galactosidasa. Las enzimas pueden eliminar selectivamente distintos componentes celulares y también elementos no deseables de la matriz aunque no es posible lograr la decelularización completa de un órgano sólo con agentes enzimáticos y además la permanencia de residuos enzimáticos en la MECd puede dificultar el proceso posterior de celularización así como aumentar la probabilidad de reacciones inmunológicas adversas (103). Las **Nucleasas** como DNAases y RNAases al fragmentar las secuencias de ADN facilitan la eliminación de nucleótidos tras la lisis celular (46, 110, 118, 119). Las **endonucleasas** como la Benzonasa son más efectivas que las exonucleasas porque rompen las cadenas de ADN en regiones intermedias y no terminales (46). La **Tripsina** es una serín proteasa muy utilizada como agente decelularizante. Al igual que ocurre con los detergentes, la decelularización mediada por tripsina es tiempo dependiente pero el proceso es mucho más lento (33). Con respecto a la preservación de la matriz en comparación con los detergentes, la tripsina conserva mejor los GAGs pero el colágeno y la elastina son más sensibles y tienen resistencia limitada a la misma (30, 31, 114, 125). En muchos protocolos de decelularización se utiliza tripsina como agente inicial, especialmente en tejidos densos ya que produce fácilmente disrupción de la ultraestructura tisular facilitando así la penetración de otros agentes en un segundo paso (118).

Entre los **agentes biológicos no enzimáticos** destaca el empleo de agentes quelantes como el ácido etileno diaminotetraacético (EDTA) y el ácido etileno glicol tetraacético (EGTA). Estos agentes contribuyen a disociar las células de las proteínas de la matriz y también producen disrupciones proteína-proteína mediante el secuestro de iones de metal. Son insuficientes como agentes aislados para la decelularización completa pero se incluyen en muchos protocolos asociados a enzimas y/o detergentes. Los inhibidores de la serín- proteasa como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), aprotonina y leupeptina previenen el daño de la MECd que puede ocurrir como consecuencia de la liberación de proteasas intracelulares durante la lisis celular. También se emplean antibióticos y antimicóticos como penicilina, streptomycin, antotéricina B y acida de sodio (NaN_3) para minimizar la contaminación durante la decelularización (103).

1.2.2.3 Criterios de decelularización de la matriz

La eliminación del 100% de los componentes celulares de un tejido u órgano es muy difícil de conseguir. De hecho, en las MECd siempre se detecta una mínima cantidad de ADN residual y otros componentes del núcleo y citoplasma de las células eliminadas. La presencia de material celular residual en la matriz puede originar problemas de citocompatibilidad *in vitro* y respuestas adversas del huésped *in vivo* (126, 127). Por ello, basándose en los hallazgos de estudios en los que *in vivo* se ha observado una respuesta de remodelado de la matriz a la vez que se han evitado respuestas adversas del huésped, Crapo y colaboradores (103) describen los siguientes criterios mínimos para considerar que un tejido u órgano ha sido exitosamente decelularizado:

1. Cuantificar < 50ng de ADN de doble cadena (dsDNA) por mg de MECd (tejido seco o húmedo).
2. La longitud del fragmento de ADN residual debe ser < 200 pares de bases (bp).
3. Ausencia de material nuclear visible en cortes histológicos teñidos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) o con Hematoxilina-eosina (H&E).

La ausencia de material nuclear se utiliza como criterio de decelularización porque el ADN residual se correlaciona directamente con las reacciones adversas del huésped. Además permite comparar fácilmente los diferentes tejidos y órganos decelularizados ya que es un componente común en todos ellos y es fácilmente cuantificable.

1.2.3. Células candidatas para recelularizar el parénquima de la matriz

Un órgano complejo está esencialmente formado por células parenquimatosas, específicas del órgano, células estromales o de soporte y por un sistema vascular. La elección del tipo de células necesarias para regenerar estos tres componentes y formar tejido biológico funcional en el seno de la matriz es uno de los aspectos cruciales y aún no resuelto en bioingeniería tisular. Los principales tipos celulares utilizados para recelularizar el parénquima de MECd tridimensionales se describen a continuación.

1.2.3.1. Células parenquimatosas adultas

Para recellularizar una matriz biológica una posibilidad es utilizar las propias células adultas maduras de ese órgano, que podrían obtenerse a partir una biopsia o de un órgano donante. Así, se han utilizado células renales humanas en matrices renales porcinas (90) y células epiteliales y fibroblastos de origen pulmonar en matrices de pulmón (51, 52). Numerosos trabajos han utilizado hepatocitos sobre matrices hepáticas decelularizadas con resultados muy positivos, demostrando un porcentaje muy alto de células que perviven en la matriz y un bajo porcentaje de células apoptóticas (67-70, 73). Uygun y colaboradores (67), demostraron que las matrices de hígado de rata recellularizadas con hepatocitos *in vitro* producían albúmina y urea; además, trasplantadas en ratas receptoras, los hepatocitos sobrevivieron durante 8 horas con mínimos cambios isquémicos.

Sin embargo, con la excepción de los hepatocitos, en general las células parenquimatosas adultas tienen una capacidad de proliferación muy restringida y es muy complicado expandirlas *in vitro* hasta obtener células en número suficiente como para regenerar un órgano completo.

1.2.3.2. Células madre

La célula ideal para regenerar un órgano completo debería tener la capacidad de proliferar en número suficiente para repoblar la MECd y por otro lado ser capaz de diferenciarse en los diferentes tipos celulares necesarios para reconstruir el órgano. El tipo celular que teóricamente cumple mejor estas dos premisas es el de las células madre o progenitoras (*stem cell* en inglés). Una célula madre por definición tiene capacidad de auto-renovación y además es capaz de diferenciarse en otra célula más especializada. El potencial de diferenciación de las células madre varía según el tipo celular pudiendo clasificarlas, de mayor a menor capacidad de diferenciación en **células madre totipotenciales**, capaces de originar un organismo completo (tanto tejido embrionario como extra-embrionario); **células madre pluripotenciales** (células que pueden originar las 3 capas germinales del embrión); **células madre multipotenciales** (pueden diferenciarse a tipos celulares derivados de su misma capa germinal) y **células madre unipotenciales** (su capacidad de diferenciación se restringe a un único tipo celular).

En función de su origen, además pueden clasificarse en **células madre embrionarias**, **células madre fetales** y **células madre adultas**.

1.2.3.2. a. Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (ESCs, del inglés *embryonic stem cells*) son células obtenidas a partir de la masa celular interna del blastocisto (128). Bajo condiciones adecuadas pueden proliferar en grandes cantidades e indefinidamente sin diferenciarse y son células pluripotenciales, es decir, pueden originar las tres capas germinales del embrión y por tanto cualquier línea celular. Por ser células muy precoces en el desarrollo embrionario carecen de modificadores epigenéticos. Sin embargo su empleo está condicionado fundamentalmente por cuestiones éticas. Otros inconvenientes con respecto a su uso son los derivados de la inmunogenidad ya que son células de origen alogénico y la posibilidad de desarrollar teratomas si se implantan en un estado muy indiferenciado.

En bioingeniería tisular, los trabajos realizados con ESCs tienen el objetivo de valorar el efecto que ejerce la MECd sobre la diferenciación celular, habiéndose utilizado en varios trabajos ESCs de ratón y ESCs humanas sobre matrices de riñón (85, 86, 93), pulmón (48, 92) y corazón (38). En general, puede afirmarse que las matrices tridimensionales facilitan la diferenciación de células embrionarias en comparación con medios de cultivo convencionales 2D aunque por mecanismos no completamente aclarados.

1.2.3.2. b. Células madre fetales

Se han empleado células madre de origen fetal en varios modelos animales para recellularizar matrices biológicas. En general, cuando estas células se siembran en matrices decelularizadas mantienen sus marcadores fenotípicos, pueden ordenarse espacialmente en el seno de la matriz e incluso desarrollar ciertas funciones (129). Varios estudios han demostrado que células fetales o neonatales pulmonares de rata participan en el intercambio gaseoso cuando se siembran en pulmones de rata decelularizados (45, 46). De manera similar células neonatales renales producen urea en matrices de riñón *in vivo* (91) y en hígados recellularizados con hepatocitos fetales se observa producción de albúmina y urea (68, 70, 75, 77, 80). Las células madre de origen fetal son muy útiles como “prueba de concepto” en muchos trabajos de recellularización de matrices en modelos animales pero en general carecen de aplicación clínica en el desarrollo de órganos bioartificiales adultos humanos.

Un caso particular son las **células madre presentes en líquido amniótico humano (hAFSCs**, acrónimo de *human amniotic fluid stem cells* en inglés). Estas células se obtienen de mujeres gestantes donantes que requieren una amniocentesis entre la 15 y 19 semana de gestación para diagnóstico prenatal de determinadas anomalías fetales. El líquido amniótico humano

contiene una población heterogénea de células que derivan de estructuras placentarias y de la piel, aparato digestivo, respiratorio y tracto urinario fetal. Contiene tanto células maduras como células fetales indiferenciadas, las cuales pueden aislarse y expandirse en cultivos, tienen alta capacidad proliferativa y pueden diferenciarse en múltiples líneas celulares (hAFSCs) (130). Todas estas características las han convertido en una fuente atractiva en BT, habiéndose descrito su capacidad de diferenciación en adipocitos y osteocitos (131, 132), condrocitos (133), cardiomiocitos (134) y células neurales (135) tanto *in vitro* como *in vivo*.

1.2.3.2. c. Células madre adultas

Las células madre adultas son un grupo amplio y heterogéneo de células madre que tienen su origen en cualquier tejido después del nacimiento. Su capacidad de proliferación y diferenciación es mucho más limitada que la de las células embrionarias, no siendo capaces de originar *in vitro* tejidos complejos de manera espontánea pero no tienen las limitaciones éticas que sí presenta la utilización de ESCs.

En este grupo se incluyen las **células madre obtenidas de médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical** así como las **células progenitoras residentes en órganos sólidos**.

➤ **Células madre derivadas de la médula ósea**

La médula ósea (MO) es la principal fuente de células madre adultas. Es una fuente de células autólogas, su extracción es relativamente sencilla y se han caracterizado varias poblaciones celulares con potencial de diferenciación.

La MO se divide en dos compartimentos interrelacionados. Por un lado el parénquima, donde encontramos la mayor parte de la celularidad de la médula. Son células hematopoyéticas en distintos estadios de diferenciación. Se calcula que diariamente este compartimento produce unos 500 billones de células sanguíneas. Asociado al parénquima, se encuentra el estroma, compuesto por el sistema vascular de la médula (una red de vasos finos fenestrados) rodeados de células hematopoyéticas. En el estroma existe una población minoritaria y heterogénea de células cuya principal función es servir de “nicho” ó soporte a las células hematopoyéticas creando el microambiente necesario para que éstas puedan diferenciarse. Aquí se encuentran células endoteliales, fibroblastos, adipocitos, células osteogénicas y células precursoras no hematopoyéticas (136).

Las **células mononucleadas derivadas de la médula ósea (BMMNCs)** se obtienen fácilmente por gradiente de densidad tras aspirado medular directo o de sangre periférica tras

movilización mediante el factor estimulante de colonias granulocíticas (GCSF). Con esta técnica se obtiene una población de células mononucleadas heterogénea, compuesta por monocitos, células precursoras hematopoyéticas (CPHs), precursores endoteliales y células no hematopoyéticas con inmunofenotipos variables. Numerosos estudios han analizado el potencial de las BMMNCs en medicina regenerativa, en particular en modelos animales de isquemia miocárdica aguda y crónica. Entre sus efectos beneficiosos se ha observado la capacidad de inducir angiogénesis, (137), disminuir el grado de apoptosis (138) y efectos positivos sobre el remodelado y dilatación ventricular (139).

Dentro de la población mononucleada total se han aislado varias poblaciones de células madre no hematopoyéticas que se describen a continuación.

El cultivo *in vitro* de las células BMMNC permite obtener por adhesión al plástico las **células mesenquimales derivadas de médula ósea (BMSCs)**, que son células con propiedades pluri/multipotenciales. Globalmente suponen un porcentaje muy pequeño del total de células de la médula (0,001-0,01%) (140) y además este porcentaje disminuye con la edad (141). Células con características mesenquimales similares a las de la MO se han aislado posteriormente en otros muchos órganos, principalmente tejido adiposo y cordón. A todos estos tipos celulares se les conoce bajo el término de células mesenquimales o células del estroma (MSCs). Sus características como grupo se explican más adelante.

Las **células progenitoras endoteliales (EPC)** son células que expresan los marcadores de superficie KDR, CD 34 y AC133 (142) y se movilizan desde la MO en respuesta a estímulos como la isquemia o el daño vascular. Estas células favorecen la angiogénesis de manera directa al originar células endoteliales (143, 144), pero también por un mecanismo paracrino (145).

Se han descrito también otras poblaciones de células progenitoras pluripotenciales raras como son las **células progenitoras multipotentes adultas (MAPCs, del inglés progenitor multipotent stem cells)** (146-148); **células inducibles de multilinaje adultas aisladas de médula ósea (MIAMI, del inglés marrow isolated adult multilineage inducible)**(149); y células madre pequeñas parecidas a células embrionarias, conocidas como **VSEs** (del inglés, *very small embryonic like*) (150).

En bioingeniería tisular, la MO se utiliza como fuente de células MSC para recellularizar matrices y como fuente de precursores endoteliales, células endoteliales maduras y células musculares lisas para recellularización de constructos vasculares.

➤ Células madre derivadas de tejido adiposo

El tejido adiposo, como la médula ósea, deriva de la capa mesodérmica. Además de adipocitos, contiene otras poblaciones celulares minoritarias entre las que se encuentran células maduras (fibroblastos, células vasculares y hematopoyéticas) y también células precursoras. La fracción celular no adipocítica se obtiene del lipoaspirado tras un proceso de digestión enzimática y centrifugación denominándose fracción estromal vascular (SVF, *del inglés Stromal Vascular Fraction*). Este compartimento es rico en células con capacidad multi y/o pluripotente (151, 152); en la fracción estromal vascular se han aislado CPHs, precursores adipocíticos, vasculares (tanto endoteliales como de músculo liso) e incluso células precursoras cardíacas y de músculo esquelético.

El cultivo *in vitro* de la SVF da lugar a una población celular más homogénea con propiedades mesenquimales, similares en muchos aspectos a las BMSCs, aunque no idénticas, denominada **células madre derivadas del tejido adiposo (ASCs, *del inglés Adipose tissue – derived Stem Cells*)**. Las células ASC y BMSC comparten propiedades comunes llegando a afirmar algunos autores que son inmunofenotípicamente idénticas en un 90% (151) aunque se han descrito diferencias a nivel genómico, proteómico y funcional que apuntan a un mayor potencial angiogénico de las ASCs en comparación con las BMSCs (153).

Las células ASC han demostrado su capacidad *in vitro* para diferenciarse en tipos celulares de las tres capas del embrión en numerosos trabajos. Se ha demostrado así su potencial de diferenciación osteogénico, condrogénico y adipogénico; su capacidad para diferenciarse en cardiomiocitos, incluso espontáneamente, para originar células endoteliales, epiteliales, células neurales y células de origen endodérmico como hepatocitos. (Figura 4). Varios trabajos han identificado a estas células ASC pluripotenciales con un inmunofenotipo específico, CD34⁺, CD45⁻/CD31⁻ (154-156).

El potencial pluripotencial de las ASCs *in vitro*, la facilidad de acceso al tejido adiposo y la gran cantidad de células ASC que pueden obtenerse por lipoaspirado, las ha convertido en una fuente de estudio en medicina regenerativa muy importante en la última década, habiéndose realizado múltiples trabajos para valorar su comportamiento, capacidad de diferenciación y potencial terapéutico en modelos animales *in vivo* de muchas enfermedades (revisado en (157-159).

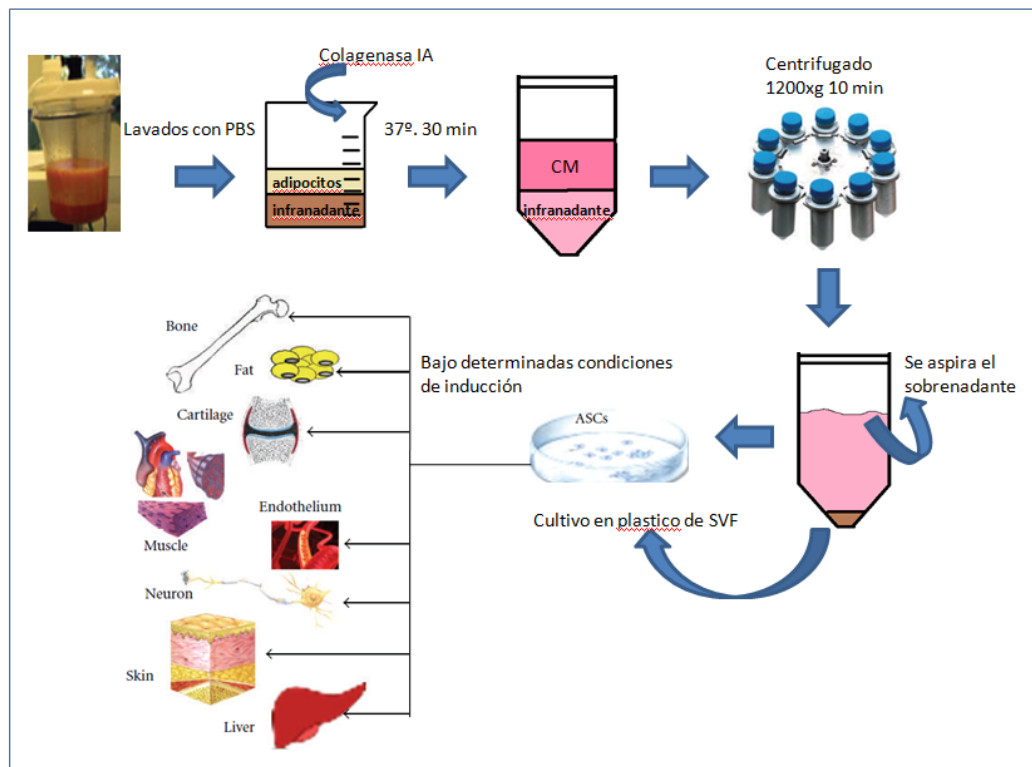


Figura 4. Esquema que muestra la técnica de lipoaspirado, digestión y centrifugado para la obtención de la SVF de tejido adiposo. El cultivo en plástico permite obtener la población de ASCs que puede diferenciarse *in vitro* en múltiples líneas celulares. [Modificado de Zuk et al, 2012, (158)].

➤ Células madre derivadas de cordón umbilical

El cordón umbilical es la tercera fuente principal de células mesenquimales, habiéndose utilizado también en trabajos de recelularización de matrices, como el estudio de Oberwallner y colaboradores (42), en el que sembraron células mesenquimales de cordón humanas en secciones de matrices cardíacas también de origen humano.

Características de las células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales o células del estroma mesenquimal fueron halladas y descritas por primera vez en la médula ósea por Friedenstein (160) que las describió como unas células “adherentes de morfología fibroblastoide” pero posteriormente se han encontrado en otros tejidos. Los rasgos fenotípicos que las definen son: ser células adherentes al plástico de cultivo, expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79α o CD19 y HLA-DR y ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos (161).

Como ya se ha comentado, la MO es la principal fuente de células mesenquimales (BMSC) pero se han hallado células similares en otros tejidos y órganos adultos y perinatales como

tejido adiposo (ASCs), cordón umbilical, cartílago, cerebro, pulpa dental, endometrio, piel, líquido y membranas amnióticas, placenta y gelatina de Wharton. Otra fuente novedosa son las células mesenquimales derivadas de células humanas iPS (iPSC-MSCs) (162). Hoy se acepta que los tipos de MSCs hallados en distintos órganos y tejidos son un grupo heterogéneo de células madre pero con unas propiedades generales que puede resumirse en los siguientes puntos:

a). Tienen **capacidad de proliferar y expandirse fácilmente in vitro**, siendo posible obtener un número suficiente para su aplicación clínica (163).

b). Tienen importantes **propiedades inmunomoduladoras**. Expresan niveles muy bajos de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (HLA-I) y no expresan antígenos tipo II (HLA-II) ni otros coestimuladores como CD40, CD80 y CD 86 (164). Todo ello las protege de la lisis celular mediada por células Natural Killer (NK) (165). Las MSCs humanas además expresan HLA-G, un antígeno HLA-I no clásico, que parece evitar la respuesta inmune contra estas células. Además son capaces de inhibir al sistema inmunológico tanto por contacto directo célula-célula con linfocitos T y B, células NK y dendríticas (166-171), como mediante la liberación de mediadores como la interleucina 10 (IL-10) y prostaglandinas y factores de crecimiento (172, 173). Esta capacidad para evadir el sistema inmunológico hace de las MSCs un tipo celular interesante como posible terapia celular alogénica.

c). **In vivo inducen reparación y/o regeneración tisular**. Tienen la capacidad de dirigirse hacia la zona de inflamación de un tejido dañado (174) y, una vez localizadas en la zona de lesión, inducen reparación tisular. Esta regeneración tisular está mediada por un mecanismo fundamentalmente paracrino (175). De este modo, la liberación de factores de crecimiento [factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos entre otros] y citoquinas (TGF β , IL-10, IL-6) (176) inducen a las células residentes progenitoras a reparar el tejido dañado. Por efecto paracrino, las MSCs pueden inducir angiogénesis, previenen fenómenos de muerte celular programada (efecto antiapoptótico), previenen la fibrosis tisular, reclutan a células progenitoras residentes en el tejido, las inducen a dividirse y crean el microambiente necesario para que estas células progenitoras puedan diferenciarse (163). También dan soporte a las células residentes del tejido mediante la liberación de glicoproteínas de la matriz (176). Como se ha comentado previamente, las células MSC *in vitro* han demostrado propiedades pluripotenciales, habiéndose descrito por ejemplo diferenciación a cardiomiocitos a partir de BMSCs (177-180), ASCs (181-185) y células MSC de cordón (186). Además, varios trabajos les han atribuido la

capacidad de diferenciarse *in vivo* (187-191) o fusionarse (192, 193) directamente con las células dañadas. Incluso se les ha atribuido la capacidad de transdiferenciarse hacia células endodérmicas como hepatocitos (146) o ectodérmicas como neuronas y epitelio (194).

En base a estas características, las células MSC son una fuente celular muy atractiva para los estudios de recelularización de matrices biológicas. Por un lado, sus propiedades inmunomoduladoras podrían ayudar a la integración de la matriz recelularizada una vez implantada en el huésped (175). Además, se ha observado que las matrices biológicas tridimensionales facilitan la diferenciación de MSCs hacia células parenquimatosas maduras. Este fenómeno se ha observado con BMSCs en matrices hepáticas de ratón (81), con diferentes MSCs en matrices cardíacas de cerdo (195) y parches de miocardio humano (42), y con ASCs y BMSCs en pulmones decelularizados de rata (62).

➤ **Células madre residentes en órgano sólido/ órgano-derivadas**

En la mayoría de los tejidos adultos de mamíferos existe una pequeña población de células madre residentes, en general de menor tamaño que las células adultas del tejido y que expresan determinados marcadores propios de células indiferenciadas como CD133, CD44, nestina y/o ABCG2. Se han encontrado en pared vascular, músculo esquelético, corazón, pulmón, hígado, páncreas, tracto digestivo, piel, retina, mama, ovarios, próstata y testículo (196). Hasta el hallazgo de estas células, tradicionalmente se había asumido que algunos de los órganos mencionados como corazón, pulmón o páncreas, tenían una capacidad de autoregeneración inexistente (102).

En general las células madre residentes están localizadas en el tejido dentro de un microambiente especial denominado “nicho” rodeadas de células vecinas como fibroblastos, células endoteliales y componentes del estroma que regulan sus funciones a través de interacciones directas y liberación de factores solubles. Las células madre residentes tienen capacidad de autorenovación y de diferenciarse en los tipos celulares propios del órgano en el que residen pero habitualmente están en un estado quiescente y raramente se dividen bajo condiciones normales pudiendo proliferar, sin embargo, como respuesta a daño tisular. En estos casos lo que en general se ha observado es que, o bien se dividen en dos células idénticas indiferenciadas (autorenovación) o en una célula idéntica y en otra diferenciada.

Suponen una línea de investigación muy prometedora pero a fecha de hoy, en general son células muy difíciles de reclutar y en cualquier caso, de momento no han podido ser expandidas *in vitro* en número suficiente como para recelularizar un órgano completo.

1.2.3.3. Células pluripotentes inducidas.

Una célula adulta madura puede regresar a un estado más indiferenciado y transformarse en una célula madre pluripotencial si se “reprograma” genéticamente para ello, son las denominadas células pluripotentes inducidas (células iPS). Este fenómeno fue descrito por primera vez en el año 2006 por el grupo de Yamanaka. A través de la inoculación de retrovirus que expresaban los factores de transcripción de pluripotencialidad OCT 3/4, SOX2, c-myc y Klf-4 en fibroblastos de ratón, consiguieron reprogramar los fibroblastos a células madre pluripotenciales (197). Muchos otros grupos han reproducido estos resultados y en el año 2008 ya aparecieron los primeros trabajos con células iPS humanas (102) existiendo actualmente muchas líneas de células iPS humanas disponibles.

El descubrimiento de las células iPS ha supuesto un gran avance en medicina regenerativa. Estas células comparten similitudes con las células embrionarias ya que pueden proliferar *in vitro* en grandes cantidades y diferenciarse en muchas líneas celulares dando lugar tanto a células parenquimatosas como a células de soporte. Además, a diferencia de las ESCs, las células iPS pueden ser de origen autólogo y su obtención y uso no tiene tantas limitaciones éticas. Todas estas características las convierten en un tipo celular muy interesante en BT perfilándose como muy buenas candidatas para la recelularización de matrices. Sus principales inconvenientes son la posibilidad de tumorigenicidad si se implantan en un estadio indiferenciado y su baja eficiencia. Hasta hace poco otro inconveniente era la necesidad de utilizar vectores retrovirales durante la reprogramación pero hoy en día es posible producir células iPs por mecanismos virales-independientes.

Las células iPS se han utilizado en algunos protocolos sobre matrices decelularizadas. Ghaedi y colaboradores utilizaron células iPS humanas diferenciadas a células del epitelio alveolar tipo II (AETII) que sembraron sobre matrices decelularizadas de pulmón de rata y humano (60). Otros investigadores han utilizado también células iPS sobre matrices cardíacas, en concreto, cardiomiocitos derivados de iPS (41, 42).

1.2.3.4. Células de soporte

Además de las células necesarias para repoblar la MECd, las células de soporte como los fibroblastos son importantes para el remodelado de la matriz y para dar soporte a las células sembradas sobre la misma (198). Varios trabajos han mostrado que las células de soporte añadidas a las células candidatas a repoblar las matrices facilitan la adhesión y supervivencia de estas últimas en el seno de las matrices decelularizadas (129).

1.2.4. Tipos celulares utilizados para recelularización vascular

La endotelización del sistema vascular de la matriz es un aspecto crucial en el desarrollo de tejidos u órganos bioartificiales ya que el objetivo último es el implante y funcionamiento del tejido u órgano *in vivo* y para ello es esencial prevenir fenómenos de trombosis y/o hemorragias derivados de un sistema vascular insuficientemente endotelizado (102, 198).

Las **células endoteliales** son las principales células utilizadas para recelularización vascular. Las células endoteliales de aorta de rata fueron las empleadas en el primer trabajo de decelularización y recelularización de un órgano completo (34). Una de las fuentes más comunes son las células endoteliales humanas obtenidas de vena umbilical (HUVEC). Se han utilizado en muchos protocolos de recelularización en matrices de distintos modelos animales con buenos resultados. En general se observa que las células HUVEC se dirigen y se alinean en los vasos grandes y pequeños de las matrices recelularizadas (68, 71, 72, 91). Órganos recelularizados y endotelizados con HUVEC (pulmón, riñón) se han trasplantado ortotópicamente en ratas sin desarrollar fenómenos de hemorragia y/o trombosis (91, 199). Otros trabajos de recelularización de matrices han utilizado **células microvasculares endoteliales** (46, 67) aunque con peores resultados que la células HUVEC mostrando revascularización incompleta y fenómenos de trombosis y sangrado. También se han empleado **células precursoras endoteliales (EPC)** observando que se adhieren y dispersan a lo largo del compartimento vascular de matrices de pulmón (63) y corazón (39).

ESCs, MSCs y las células iPS, por su capacidad de diferenciación hacia endotelio, también se han utilizado en recelularización de matrices decelularizadas. (85, 86, 93, 94).

1.2.5. Métodos de recelularización

En el proceso de recelularización de una MECd se distinguen dos fases: una primera fase de sembrado celular y una segunda etapa de cultivo de la matriz recelularizada en el que el objetivo es preparar a las células para su correcto funcionamiento *in vivo*.

1.2.5.1. Sembrado celular

En esta primera fase las células se implantan en la MECd con el objetivo de conseguir una distribución espacial lo más similar posible a la distribución de las células del órgano nativo. Para optimizar este proceso hay tener en cuenta varios aspectos:

1. Los **tipos de células** elegidos para sembrar la matriz. Ninguna de las células utilizadas en BT ha demostrado por el momento ser capaz de manera aislada de originar un órgano completo en el seno de una MECd (102) por lo que parece lógico implantar varios tipos celulares. Qué células son más apropiadas para sembrar en la matriz, el orden en que deben implantarse o si es mejor hacerlo de manera simultánea son cuestiones aún no resueltas. La célula elegida dependerá del órgano en concreto, si bien en la mayoría de los trabajos con MECd de órgano sólido (corazón, hígado, riñón, pulmón y páncreas) se emplea una combinación de células madre (ESCs, MSCs, células iPS) y/o células fetales junto con células endoteliales o con potencial para diferenciarse en células endoteliales. [Para una revisión completa ver (200)]. El objetivo último es obtener células parenquimatosas órgano-específicas, células de soporte y una endotelización adecuada de la matriz.
2. El **número de células** necesario para sembrar la matriz es otro aspecto muy importante y que depende mucho del órgano recelularizado. En el caso de los órganos con funciones metabólicas como hígado o páncreas, no parece necesario disponer del 100% de la masa celular del órgano nativo para lograr normofuncionamiento del tejido bioartificial e implantarlo en el receptor. Así, varios trabajos han observado en modelos de rata (201) y en humanos (202, 203) mejoría clínica y de la función hepática con el trasplante de < 10% de los hepatocitos que constituyen la masa celular original del hígado del huésped. Sin embargo, en el caso del corazón, para conseguir un órgano funcional habría que recelularizar casi completamente la matriz antes de su implante. Para ello existen dos opciones teóricas: bien implantar un gran número de células maduras en la matriz o sembrar un número más reducido de células madre y dejarlas expandirse y diferenciarse en un medio de cultivo adecuado *in vitro* (102).

3. **La técnica de sembrado.** Las células pueden ser depositadas directamente sobre la matriz (35-37, 42, 87-90, 92), inyectadas en la misma (40, 195), infundidas a través del sistema vascular del órgano (38, 41, 86, 93, 94) o por una combinación de los dos últimos métodos (34, 44). En algunos órganos se han utilizado distintas rutas de infusión además de la vascular, como en el pulmón (vía aérea y vascular) o en el riñón (vía arterial y uréter) (85, 91). También se ha probado con la infusión por distintas vías vasculares en el mismo órgano, como es el caso del trabajo de Robertson y colaboradores, en el que se utilizó la aorta, la vena cava inferior y el tronco braquiocefálico para infundir células a matrices de corazones de rata (43). En general, aunque la experiencia aún es limitada, la técnica de infusión parece ser mejor que la inyección directa si lo que se pretende es repoblar la matriz de una manera más homogénea y similar a la distribución celular del órgano nativo. Por el contrario, las inyecciones a nivel local dan lugar a una alta densidad celular en la zona proximal a la inyección que va disminuyendo progresivamente. Como inconveniente, la liberación de las células a la matriz por perfusión puede tener un efecto deletéreo en las células debido a la presión y el flujo necesario de administración. También puede tener un efecto de “lavado”, de manera que las células pueden perderse a medida que se infunden en el caso de que no sean capaces de adherirse a la matriz.

4. **El número de dosis** a aplicar y **la concentración celular** son otros dos aspectos importantes (102, 129). El sembrado con una alta concentración celular aumenta la probabilidad de formación de agregados que podrían ocluir los vasos y causar necrosis. La mejor opción parece, por tanto, utilizar bajas concentraciones de células y/o varias infusiones en lugar de un solo bolo con alta densidad celular en perfusión continua (129).

5. Los distintos tipos celulares tienen preferencias de adhesión por determinadas proteínas del espacio intersticial por lo que el **recubrimiento de las MECd** con estas proteínas se ha propuesto como técnica para mejorar el rendimiento de sembrado celular. Así, ESCs de ratón se adhieren fuertemente a laminina y fibronectina. El recubrimiento de MECd de pulmón de rata con estas glicoproteínas previo al sembrado celular demostró en un trabajo un incremento de la unión de ESCs de ratón a la matriz, un aumento de celularidad y una mejor dispersión de las células a lo largo de la matriz (53). Otros grupos han investigado las preferencias de unión que las MSCs tienen por la MECd y se ha observado que diferentes tipos de unión pueden promover una mejor adhesión y diferenciación de estas células (49, 50, 204). En válvulas decelularizadas el plasma rico en plaquetas (205) y el factor de

crecimiento de hepatocitos –fibronectina (206) han demostrado mejorar la adhesión de células mesenquimales a la matriz acelular valvular.

1.2.5.2. Cultivo de la matriz. Biorreactores.

Tras el sembrado celular, la matriz recelularizada necesita una fase de maduración en un medio de cultivo con el objetivo de lograr la supervivencia de las células implantadas, y en el caso del empleo de células progenitoras, lograr su expansión y diferenciación en células maduras funcionales para la implantación del órgano in vivo.

La técnica de elección utilizada para el cultivo de matrices tridimensionales de órganos complejos es la perfusión a través de un biorreactor (207-209) cuyo objetivo es aportar nutrientes, oxígeno y eliminar los residuos del metabolismo celular así como simular de la manera más fiel posible las condiciones fisiológicas propias del órgano.

El medio de perfusión utilizado en el cultivo de órganos bioartificiales está basado en el de los medios de cultivo *in vitro* utilizados para las células que constituyen esos órganos. Además, un factor único en el cultivo de órganos completos es la presencia de la propia MECd, que como ya se ha mencionado aporta factores adicionales que favorecen la supervivencia y la maduración de las células (102).

1.2.5.2.a. Parámetros de cultivo celular

En los protocolos de cultivo en biorreactores se tienen en cuenta muchos parámetros (temperatura, volumen, presión, flujo de administración, oxigenación, pH, metabolismo celular entre otros) que son monitorizados e incluso algunos pueden ajustarse en función de las necesidades y los cambios que se vayan produciendo en la matriz.

Para la recelularización de MECd se emplean **temperaturas** en el rango fisiológico lo que se consigue con el medio de cultivo en incubadoras o en reservorios con camisa de agua.

La adecuada **oxigenación** de las células es uno de los aspectos cruciales durante el cultivo de la matriz. En los cultivos tradicionales, la oxigenación se realiza fundamentalmente por difusión con la consiguiente limitación que ello supone en cuanto al grosor de tejido que puede ser debidamente oxigenado. Por el contrario, las matrices tridimensionales, a través de su sistema vascular, permiten que el oxígeno alcance a las células por perfusión por lo que es factible que el oxígeno llegue a todo el órgano. Sin embargo, en ausencia de capilares, es necesario administrar oxígeno en el medio a una presión superior a la atmosférica. El abordaje

habitual consiste en enriquecer el medio de perfusión con una mezcla de 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono (CO₂) a través de un oxigenador de membrana que forma parte del biorreactor. Con ello se consigue una presión parcial de oxígeno de aproximadamente 360mmHg (67). Si se requieren mayores demandas de oxígeno debido a un mayor número de células pueden utilizarse transportadores de oxígeno como perfluorocarbonos (210), hematíes con un hematocrito alrededor del 20% (211) o sangre (212). De todos ellos el sistema preferido son los hematíes porque los transportadores artificiales de oxígeno se oxidan rápidamente y la sangre puede iniciar una respuesta inflamatoria debido a su inmunogenicidad.

Un aspecto muy importante es la monitorización y ajuste de la **presión y el flujo** ya que, a medida que aumenta la celularidad de la matriz, la porosidad disminuye y aumenta la presión (73). Por tanto, ajustar la tasa de flujo del medio de perfusión a medida que aumenta la presión es muy importante para evitar daños mecánicos a las células implantadas. El carácter pulsátil o continuo del flujo administrado también es importante, especialmente en el caso de las células endoteliales, que parecen preferir una perfusión de flujo pulsátil (213).

Algunos biorreactores también cuantifican los **niveles de glucosa y lactato** en el medio (34, 40, 45, 70, 86, 94), parámetros que se correlacionan con el metabolismo de las células en la matriz, con el número de células y con las condiciones de oxigenación del medio indicando si la perfusión es la adecuada o no.

1.2.5.2.b. Estímulos biofísicos

La aplicación de estímulos biofísicos, específicos de cada órgano, es otro aspecto fundamental para el desarrollo de órganos funcionantes. Diferentes estímulos químicos, mecánicos (214, 215) o eléctricos (34, 195) tienen un papel esencial en mantener el fenotipo de las células implantadas y/o promover la diferenciación de células madre.

1.3. Bioingeniería tisular aplicada a tejidos cardíacos

El corazón es un órgano con una densidad celular muy elevada estimada en aproximadamente 10^8 cardiomiocitos/cm³ y altas demandas metabólicas (27,6 nmol/mg [protein.min]) (37) por lo que los miocitos cardíacos consumen mucho oxígeno y no toleran bien la hipoxia. Los cardiomiocitos forman una estructura tridimensional que facilita la propagación de señales eléctricas a través de uniones intercelulares especializadas para producir la contracción mecánica necesaria para bombear sangre al organismo. Por otro lado, aunque existen células madre residentes en el corazón, es general es un órgano con escasa capacidad intrínseca de reparación (136). Tras un infarto de miocardio, se desencadena una respuesta inflamatoria intensa y las células muertas son eliminadas por macrófagos. En las siguientes semanas y meses, fibroblastos y células endoteliales migran y forman tejido de granulación que finalmente se convierte en una cicatriz rígida. La escara reduce la función ventricular, produce adelgazamiento de la pared, remodelado y finalmente, insuficiencia cardíaca.

El diseño de tejidos cardíacos bioartificiales no es una idea nueva. A finales de la década de los 50, Moscona creó agregados esferoidales a partir de cardiomiocitos de embrión de pollo cultivando células aisladas en un matraz Erlenmeyer bajo rotación continua. Después de 18 horas los agregados formados tenían más de 200 células (199). Casi 30 años después se observó que los cardiomiocitos *in vitro* sembrados en matrices de colágeno eran capaces de formar estructuras miotubulares y que la aplicación de estímulos mecánicos mejoraba su orientación y la formación de elementos contráctiles (11, 216, 217). El primer constructo de tejido miocárdico con contracción espontánea rítmica se creó en 1997 a partir de cardiomiocitos de embrión de pollo (218). Una década después, Zimmermann y colaboradores demostraron que el implante de parches cardíacos a partir de cardiomiocitos neonatales de rata, Matrigel y colágeno líquido I mejoraba la función sistólica y diastólica de corazones en modelos de rata con infarto de miocardio (219).

Sin embargo, para su aplicación clínica, los parches de tejido miocárdico necesitan un grosor mucho mayor que los injertos de Zimmermann. Debido las necesidades metabólicas del miocardio, no es posible obtener constructos > 100-200 μ m sin un sistema vascular asociado y un soporte tridimensional. Los constructos cardíacos generados idealmente deberían estar formados por distintos tipos de células (autólogas o alogénicas inmunotoleradas) en el seno de una matriz análoga a la matriz extracelular cardíaca tanto en composición molecular, estructura y biomecánica. 3 aspectos característicos del miocardio nativo deben tenerse en

cuenta a la hora del diseño de tejidos cardíacos: la alta densidad celular de cardiomiocitos y células de soporte, el intercambio de oxígeno eficiente entre sangre y células y la contracción sincrónica mediante la propagación eléctrica de señales (136).

1.3.1. Matrices extracelulares cardíacas decelularizadas. Inicios.

En el año 2008 el panorama de la BT cambió radicalmente al demostrar que era posible obtener una MEC tridimensional a partir de un corazón completo con la técnica de decelularización por perfusión (34). Ott y Taylor utilizaron una perfusión de SDS durante 12 h por vía anterógrada coronaria a través de la aorta para decelularizar corazones de rata, seguido de aguda deionizada y Tritón X-100 durante 30 minutos para eliminar los restos de SDS. Finalmente perfundieron una solución de PBS con antibióticos durante 124 h para esterilizar la matriz. Demostraron que un corazón de rata podía ser decelularizado para formar una matriz tridimensional que podía usarse como almacén para sembrar células, sentando así las bases del diseño de matrices tridimensionales biológicas. En su trabajo compararon diferentes métodos de decelularización utilizando SDS, Tritón X-100 y polietilenglicol. Concluyeron que el detergente iónico SDS era el método más efectivo para eliminar las células del corazón. A continuación, recelularizaron la matriz obtenida con $50\text{-}70 \times 10^6$ cardiomiocitos neonatales de rata mediante 5 inyecciones intramurales en el ventrículo izquierdo y 2×10^7 células endoteliales de aorta de rata mediante infusión a través de la aorta. La matriz se mantuvo en cultivo en un biorreactor entre 8 y 28 días asociando estimulación eléctrica. Alrededor del 8º día del sembrado, las células mostraron respuesta eléctrica y contráctil a la estimulación y se observó la presencia de latido cardíaco.

Tras la publicación del corazón decelularizado de Ott y Taylor otros muchos grupos han utilizado la técnica de decelularización con modificaciones propias sobre corazones de rata (37, 39, 43, 123, 220) y ratón (38, 41). En el año 2010 Wainwright (35) y Eitan (36) publican los primeros trabajos de decelularización en corazones de cerdo, con un tamaño muy similar al humano y otros grupos han seguido con esa línea de trabajo (195, 221, 222).

Nuestro grupo fue el primero que aplicó la técnica de decelularización a un corazón adulto humano en el año 2010 (223). Guyette y colaboradores (224, 225) describieron poco después otros casos de decelularización en corazones humanos.

1.3.2. Protocolos de decelularización en modelos de corazón murino

Las MECd cardíacas se desarrollaron utilizando modelos murinos ya que existen muchos tipos disponibles y su pequeño tamaño facilita el control del proceso además de requerir menos células para recelularizar el órgano. Se han utilizado ratas Fischer F344 (34, 123), LEW/Crl (37), Wistar (40), y SpragueDawley (39, 220) con un peso medio de 300 g así como ratones con un peso medio de 30 g (38, 41).

Como se ha comentado previamente, conseguir la eliminación del 100% del contenido celular es muy difícil con cualquier técnica de decelularización. La posible respuesta inmunológica del receptor a la pequeña cantidad de ADN residual y restos celulares que quedan en la matriz tras ser decelularizada es un aspecto muy importante a tener en cuenta ya que el objetivo último es el implante de la MEC *in vivo* en el receptor. Gui y colaboradores (123) utilizaron sero-nucleasas para optimizar la eliminación del ADN residual de los tejidos decelularizados, utilizando suero fetal bovino (FBS) en diferentes concentraciones en corazones de rata Fisher F344 una vez decelularizados. Las muestras tratadas con FBS mostraron de manera significativa menos ADN residual sugiriendo que la combinación de detergentes con lavados posteriores con soluciones que contengan sero-nucleasas es un método eficaz para la eliminación celular.

Otro estudio utilizó corazones de rata LEW/Crl para comparar 4 protocolos distintos de decelularización. Aunque macroscópicamente la matriz mantenía su estructura con las 4 técnicas y la laminina estaba presente en todas las MECd obtenidas, comprobaron que ninguno de los protocolos permitía crear una MECd completamente libre de restos celulares y al mismo tiempo preservar todos los componentes de la matriz extracelular (37). Así, uno de los protocolos utilizados producía una degradación y eliminación significativa de componentes importantes de la MEC como elastina y colágeno IV y además sólo tres protocolos conservaban los GAGs en cantidad similar al órgano nativo.

Crawford y colaboradores (39) publicaron la recelularización exitosa de corazones de rata SpragueDawley decelularizados después de un año de crio-preservación. Tras decelularizar los corazones, fueron criopreservados a -80°C con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) en PBS. Al cabo de un año fueron recelularizados con 2×10^7 células endoteliales caninas mediante inyección en el miocardio. Los corazones se incubaron bajo condiciones estáticas durante 45 minutos y a continuación en un biorreactor a 37°C con 5% CO₂. El medio de cultivo se perfundió a los corazones durante 9 días. Para demostrar la ausencia de toxicidad de las

muestras, células progenitoras de sangre periférica de origen canino se pusieron en contacto con fragmentos decelularizados en pocillos de cultivo; comparados con pocillos sin tejido decelularizado, no se observaron diferencias en la proliferación celular. Los autores interpretaron estos hallazgos como ausencia de citotoxicidad de la matriz de rata hacia las células de origen canino, al no verse impedido el crecimiento celular.

Otros grupos de trabajo también han utilizado modelos de corazón murino para sembrar células de origen xenogénico. Ng y colaboradores (38) decelularizaron corazones de ratón con SDS 1% que fueron posteriormente sembrados con ESCs de origen humano y MSCs derivadas de ESC humanas. Después de 14 semanas de cultivo estático en un medio condicionado para cardiomiocitos H9c2, los corazones fueron implantados subcutáneamente en ratones con inmunodeficiencia severa. Los corazones recelularizados fueron disecados y caracterizados a las 2, 4 y 6 semanas. Las células sembradas expresaron marcadores cardíacos específicos, como cTnT, Nkx-2.5, MyL2, MyI7, MyH6 y CD31.

En otro trabajo reciente (41) se sembraron cardiomiocitos derivados de células iPS humanas en corazones de ratón decelularizados con SDS 1%. El proceso de decelularización se completó en menos de 2 horas y después de 20 días de cultivo con factores de crecimiento añadidos para facilitar la diferenciación celular, se observó contracción espontánea de las células y acoplamiento eléctrico célula- célula de manera esporádica. Se observó que las células mostraban diferenciación hacia cardiomiocitos, células musculares lisas, y células endoteliales. Se valoró la respuesta farmacológica de las células a isoproterenol demostrando un incremento x 2 de la contracción celular.

En resumen, los trabajos en modelos murinos han demostrado que es posible decelularizar con éxito un corazón completo y recelularizarlo con células endoteliales para prevenir trombosis y con distintos tipos celulares que en la matriz son capaces de contraerse. Incluso se han realizado experimentos con implante *in vivo* aunque son todavía resultados muy preliminares.

1.3.3. Protocolos de decelularización en modelos de cerdo

En los distintos protocolos de decelularización de cerdo se han usado en general las mismas concentraciones de detergentes y soluciones que para los corazones murinos. Los volúmenes de solución son mayores y los tiempos de exposición se han optimizado incluso para lograr la decelularización en menos de 1 día.

Wainwright describió el primer corazón de cerdo decelularizado, utilizando un protocolo complejo que combinaba varios agentes decelularizantes para conseguir una matriz intacta. (35). Eitan y colaboradores (36) decelularizaron parches de 3mm de grosor de ventrículo izquierdo en un proceso que duraba 48h y lo recelularizaron con distintos tipos celulares de origen xenogénico: fibroblastos cardíacos de oveja, cardiomiocitos neonatales de rata y células BMSC de rata. Se observó alta viabilidad celular con los 3 tipos de células sembradas, demostrando que la compatibilidad interespecies entre matriz y células observada en murinos era extrapolable a modelos animales grandes. En este estudio no se analizó la cantidad de ADN residual que permanecía en los parches de ventrículo tras el proceso.

Otros investigadores (221) aplicaron un protocolo basado en el de Wainwright a corazones de cerdo completo y en este caso sí se analizó la cantidad de ADN residual. Los ventrículos nativos presentaban 350ng de ADN por mg de tejido mientras que en las muestras analizadas de ventrículo decelularizado se encontró < 50 ng/mg de tejido.

Wang y colaboradores(195) describieron la decelularización de parches de ventrículo de cerdo de 20x20x3mm³ en un biorreactor giratorio. Posteriormente sembraron los parches con MSCs de rata y sometieron a los constructos a estimulación eléctrica y mecánica a través del biorreactor. Las células mostraron diferenciación expresando diferentes marcadores de cardiomiocitos como MYH7, troponina cardíaca T y α -actinina.

Merna (222) y colaboradores estudiaron el efecto de la decelularización sobre la matriz obtenida de corazones completos sometidos a un agente decelularizante biológico (tripsina) y/o a un detergente (Tritón X-100). Las propiedades mecánicas de la MECd fueron analizadas de manera no invasiva con microscopía multifotón combinada con espectroscopia observando que el Tritón X-100 preservaba el colágeno de la matriz, mientras que la tripsina originaba una matriz cardíaca mucho más débil.

Basándose en los protocolos previos, Montaham y colaboradores describieron un protocolo de decelularización que permite con SDS y Tritón X-100 decelularizar un corazón de cerdo en menos de 1 día (226).

1.3.4. Estrategias de recelularización en matrices cardíacas

El tejido cardíaco de los mamíferos es un órgano con una densidad celular muy elevada formado por múltiples tipos celulares, todos ellos esenciales para el funcionamiento global del corazón como bomba: cardiomiocitos que constituyen el músculo cardíaco y cuya ordenación

espacial permiten la contracción sincrónica cardíaca, fibroblastos necesarios para el mantenimiento y reparación de la MEC, células endoteliales y células musculares lisas que forman las paredes vasculares y diferentes tipos de células marcapasos que coordinan el ritmo cardíaco.

En BT cardíaca sobre matrices, se han utilizado distintos tipos celulares para estudiar el comportamiento de células maduras en el seno de la matriz, (parenquimatosas y endoteliales) y para valorar el papel que ejerce la matriz sobre la diferenciación de distintas células progenitoras hacia cardiomiocitos y células vasculares. Además de los tipos celulares, otros aspectos a tener en cuenta son el modo de liberación de las células, el uso de factores de crecimiento añadidos a la matriz y la aplicación de estímulos biofísicos (mecánicos y/o eléctricos) que pueden promover diferenciación celular.

1.3.4.1. Tipos celulares utilizados

Varios tipos celulares se han considerado especialmente para regeneración tisular cardíaca con el objetivo de lograr contractilidad: células ESC, células mesenquimales de distintos orígenes: células BMSC, células ASC y células de cordón; células mononucleares de sangre periférica, células madre residentes cardíacas, mioblastos de origen esquelético, cardiomiocitos derivados de células iPS y fibroblastos.

Las **células ESC de origen humano (hESC)** han demostrado su capacidad para diferenciarse en cardiomiocitos *in vitro* y en otras subpoblaciones de células cardiovasculares (227), existiendo métodos que permiten obtener cardiomiocitos en número suficiente a partir de células hESC para llevar a cabo estudios de diferenciación celular y maduración *in vitro* y capacidad regenerativa *in vivo*. Estudios *in vivo* han demostrado la capacidad que tienen para integrarse eléctricamente con el miocardio nativo (228, 229). Sobre matrices cardíacas, cabe destacar el trabajo ya mencionado de Ng y colaboradores (38) que cultivaron células hESC y células MSC humanas sobre MECd cardíacas de ratón. Ambos tipos celulares perdieron la expresión de marcadores de pluripotencialidad, observando expresión de cadena pesada de miosina- α (MYH6) en células hESC y expresión de cadena de miosina 2 (MYL2) y cadena ligera de miosina 7 (MYL7) en células MSC respectivamente. El análisis de los corazones decelularizados después del explante de los mismos de ratones inmunodeficientes mostró que las matrices sembradas con MSCs retenían más células y estaban mejor vascularizadas que las matrices sembradas con hESCs.

Las células MSC derivadas de la médula ósea tienen capacidad *in vitro* de diferenciarse en cardiomiocitos, típicamente en presencia de 5-azacitidina (5-AZT), habiendo demostrado bajo esta condición la adopción de morfología miotubular, expresión de potenciales de acción inmaduros así como expresión de varios genes específicos cardíacos (MEF-2A y MEF-2D) y péptidos como miosina, desmina, actinina y péptidos natriuréticos auricular y cerebral. También se ha observado diferenciación funcional mediante la presencia de conexiones intercelulares y actividad contráctil espontánea (230). Debido a la potencial genotoxicidad de 5-AZT, se han descrito también otros procedimientos *in vitro* que muestran la capacidad de transdiferenciación de las células BMSC a cardiomiocitos como son cultivos en medios enriquecidos con dexametasona y ácido ascórbico, proteína-2 morfogenética de hueso, factor 4 de crecimiento de fibroblastos y cocultivo con cardiomiocitos (231-233). Las células BMSC pueden producir conexina-43 y acoplarse mecánicamente con cardiomiocitos del huésped *in vivo* (234).

Como ya se ha comentado, son células con capacidad de reparar tejidos dañados por un mecanismo paracrino. Además, varios autores han descrito la capacidad de transdiferenciación *in vivo* a cardiomiocitos en estudios con modelos animales de murino con trasplante de células MSC xenogénicas (188, 190) y en modelos de animal grande con terapia celular autóloga (191) o alogénica (187, 189). Otros grupos han descrito que las BMSCs parecen fusionarse *in vivo* con cardiomiocitos del huésped (192, 193).

En relación con todas las características mencionadas, las células BMSC han demostrado capacidad de regeneración miocárdica y angiogénica en modelos animales en los que se ha objetivado reducción del tamaño de escara miocárdica, mejoría de la contractilidad segmentaria y global e incremento de densidad vascular y perfusión miocárdica (230). Estos resultados han motivado la realización de varios ensayos clínicos en humanos en infarto de miocardio, observando beneficios clínicos tras la administración de células BMSC, aunque con un incremento marginal en la fracción de eyección (235-238).

En BT aplicada a matrices cardíacas, las células BMSC han demostrado capacidad de diferenciación hacia cardiomiocitos, especialmente cuando son condicionadas con 5-AZT y son sometidas a estímulos mecánicos y eléctricos tal y como describió el grupo de trabajo de Wang sobre parches de cerdo decelularizados y sembrados con células MSC de rata y cultivados en biorreactor. A los 2 días de cultivo observaron alta densidad celular y viabilidad en los parches, las células presentaban un fenotipo cardiomiocito-like objetivado mediante la

expresión de α -actinina, cadena pesada de miosina, troponina cardíaca T, conexina-43 y N-cadherina (195).

Numerosos trabajos han demostrado el potencial angiogénico que tienen **las células mesenquimales del tejido adiposo o ASCs** y, del mismo modo que las BMSCs, la exposición a 5-AZT produce diferenciación hacia cardiomiocitos (182-185). Estos fenómenos observados son raros e impredecibles y por tanto insuficientes para generar masa miocárdica con aplicación clínica por el momento. Sin embargo, la facilidad para obtener tejido adiposo y muchas células precursoras del mismo, hace que sean una fuente celular excelente para estudios y una muy buena alternativa como progenitores vasculares.

Los mioblastos o células satélite de tejido esquelético son los precursores de las células musculares esqueléticas y normalmente se encuentran bajo la membrana basal de fibras musculares en un estado quiescente, pero pueden activarse en situaciones de daño tisular y diferenciarse en células musculares adultas. Fueron uno de los primeros tipos de células progenitoras con los que se iniciaron estudios de regeneración cardíaca por varios motivos; tienen alta capacidad proliferativa, pudiendo obtenerse del orden de 1 billón de células de una sola biopsia, y no son tan indiferenciados como otras células progenitoras, eliminando el riesgo de formación de teratomas. Pueden ser una fuente autóloga de células y son resistentes a la isquemia. Además son células miogénicas por lo que contienen un aparato contráctil completo (136). Sin embargo, estudios preclínicos han puesto en duda la capacidad de los mioblastos de músculo esquelético para acoplarse directamente con el miocardio; de hecho, se ha observado un incremento del riesgo de arritmias después de su implantación (239). Aunque los protocolos de producción celular se han mejorado sustituyendo FBS por suero autólogo y con ello se ha observado una reducción de fenómenos arrítmicos, aún así, son un tipo celular actualmente no utilizado en BT de matrices cardíacas.

Otra línea de investigación interesante son las **células madre residentes cardíacas** que varios grupos de investigación han identificado en la última década. Las primeras células progenitoras cardíacas residentes fueron descritas por el grupo del Dr. Anversa (240). Estas células tienen inmunofenotipo **c-kit⁺/Sca-1⁻**. *In vivo* tienen capacidad de diferenciación hacia cardiomiocitos, músculo liso y endotelio vascular. Otra población celular con fenotipo **Sca-1⁺/C-kit⁻** fue descrita en corazón de ratón. Son células con diferenciación a cardiomiocitos bajo estímulo con 5-AZT. Se ha demostrado además su capacidad de injerto y la expresión de marcadores cardíacos en un modelo *in vivo* de infarto (241). La población con inmunofenotipo **Sca1⁺/ckit^{LOW}/Abgc-2⁺** tiene también capacidad de diferenciación a músculo cardíaco en co-

cultivo con cardiomiocitos (242, 243). Chien y colaboradores identificaron una subpoblación de **células islet1+** que dan lugar tanto a estructuras vasculares como a cardiomiocitos predominantemente del ventrículo derecho (244). Estas células tienen el inconveniente de que necesitan ser expandidas para dar lugar a un número clínicamente relevante. Otros trabajos han utilizado una aproximación diferente para generar células cardíacas residentes a partir de biopsias endomiocárdicas obteniendo como primer paso las denominadas **cardioesferas**. Las células derivadas de estas cardioesferas expresan proteínas propias de células progenitoras y proteínas contráctiles habiendo demostrado capacidad de adhesión en un modelo de infarto en ratón (245). Sin embargo, conseguir células en suficiente cantidad sigue siendo un problema. Recientemente se ha identificado otro tipo celular, los **telocitos**, unas células intersticiales que se encuentran en el miocardio, epicardio y endocardio en nichos cardíacos donde se encuentran otras células madre residentes. Aunque su papel funcional no está del todo aclarado, parece que juegan un papel esencial como células de soporte apoyando a células madre residentes cardíacas y células angiogénicas en el miocardio (226). Los telocitos cardíacos pueden identificarse con el marcador CD34 y marcadores c-kit así como con técnicas morfológicas. En un modelo de infarto de miocardio de rata, se ha observado que 4 días después del evento isquémico el número de telocitos en el corazón está muy disminuido, y que la inyección de los mismos en corazones dañados mejora la función y reduce el tamaño de la escara (246).

Las **células iPS** son un tipo celular muy prometedor en estudios de recelularización de matrices cardíacas habiéndose realizado ya algunos estudios con células progenitoras de miocitos derivados de iPS y con cardiomiocitos derivados de iPS. Como se ha comentado previamente, Lu y colaboradores (41) utilizaron cardiomiocitos derivados de iPs sobre matrices de ratón, observando contracción espontánea a los 20 días de cultivo y respuesta a fármacos como isoprenalina. Oberwallner y colaboradores (42) sembraron también cardiomiocitos derivados de iPs de origen murino en parches de corazón humano decelularizado de 300µm de sección y lo compararon con los resultados obtenidos con MSCs de cordón humanas. Este trabajo observó que los cardiomiocitos derivados de iPS tenían menos afinidad de adhesión por la matriz que las células MSC.

Finalmente, otra alternativa podría ser la **transdiferenciación directa** de fibroblastos cardíacos en cardiomiocitos como demostraron Ieda y colaboradores (247); al añadir 3 factores de transcripción (Gata4, Mef2c y Tbx5) a fibroblastos cardíacos, observaron reprogramación a cardiomiocitos en 3 días con una eficiencia del 20%.

1.3.4.2. Métodos de sembrado celular.

Uno de los métodos más usados es la perfusión de las células a través de la aorta. En varios trabajos se ha demostrado que las células liberadas por esta vía son eficientes a la hora de repoblar matrices de órgano de animal pequeño (38, 41). Las células pueden perfundirse de manera continua o bien por intervalos para facilitar su adhesión a la matriz; algunos autores han apuntado que éste puede ser un buen método para evitar que la propia perfusión continua elimine las células que se van administrando sin apenas darles tiempo a que se fijen en la MECd (41).

La inyección directa sobre la pared ventricular es otro método utilizado por numerosos autores (34, 39, 40, 43, 44). En general se observa una densidad celular alta en el punto de inyección en el ventrículo que va disminuyendo a medida que nos alejamos del punto de punción.

Para valorar el método más eficiente a la hora de reendotelizar corazones decelularizados de rata, Robertson y colaboradores (43) probaron a perfundir células por vías vasculares distintas además de la aórtica. Utilizaron células endoteliales aórticas de rata (RAEC, del inglés *Rat Aortic Endothelial Cells*) infundiéndolas a través de la aorta, de la arteria braquiocefálica (AB), de la vena cava inferior (VCI) y por doble vía: VCI y AB. Las células perfundidas a través de la aorta no estaban uniformemente distribuidas por el corazón. Los mejores resultados se observaron con la infusión por la doble vía arterial y venosa simultánea. Además, observaron que la superficie endocárdica del VI estaba predominantemente recelularizada con células RAEC procedentes de la infusión por vía braquiocefálica y que la superficie endocárdica del VD estaba repoblada con células predominantemente infundidas por la VCI.

1.3.4.3. Optimización del cultivo

1.3.4.3.a. Factores de crecimiento y diferenciación

Para promover el crecimiento y la diferenciación celular en el seno de MECd cardíacas, además de los elementos presentes en la propia matriz tridimensional, se han utilizado distintos factores de crecimiento y diferenciación en varios modelos estudiados. Entre ellos se encuentran el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la proteína morfogenética ósea (BMP) y la angiopoietina 1 (198). (Tabla 1).

Tabla 1. Factores de crecimiento utilizados en recelularización de matrices. (Modificado de Momtahan et al).

Factor	Acción
BMP-4, Activina A, bFGF, VEGF, DKK1	Promueven diferenciación de células progenitoras cardíacas iPS derivadas, células endoteliales, células musculares lisas, y cardiomiocitos.
bFGF	Induce la proliferación de células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas, y hepatocitos
TGFB1	Mediador de respuestas inflamatorias y fibróticas
VEGF	Regula el crecimiento de vasos sanguíneos
HGF	Mitógeno de hepatocitos, incrementa la proliferación de células endoteliales
PDGF	Crecimiento de fibroblastos, células musculares lisas y otras células
BMP	Diferenciación de células en cardiomiocitos.
Angiopoietina 1	Regula procesos de integridad vascular y quiescencia

1.3.4.3.b. Biorreactores

El cultivo en biorreactores de matrices cardíacas recelularizadas permite precondicionarlas en un medio lo más fisiológico posible. El músculo cardíaco tiene que crecer y organizarse siendo muy importante las condiciones de flujo a las que está sometido en el biorreactor que deben simular la dinámica de flujo fisiológica de la sangre. Además de controlar la temperatura, mantener una adecuada oxigenación e intercambio gaseoso y aportar nutrientes a la matriz, para regenerar tejidos cardíacos tanto los estímulos mecánicos como eléctricos han mostrado capacidad generar actividad contráctil organizada (34, 195). Los biorreactores

para regeneración tisular cardíaca se han adaptado para aportar todas estas funciones a la matriz.

Ott y Taylor (34) utilizaron un biorreactor basado en un sistema de camisa de agua (Radnoti) que incorporaba transductores de presión y medidores de flujo para medir la precarga, postcarga, y los flujos de entrada y salida, con el objeto de someter a la matriz a presiones intraventriculares fisiológicas. Además, permitía estimular de manera sincrónica el constructo cardíaco a través de electrodos epicárdicos (1 Hz, 5-20V, 2 ms).

Weymann y colaboradores (44) utilizaron el biorreactor comercial BIOSTAT B-DCU II (Sartorius Stedim Biotech) en matrices cardíacas de cerdo. El sistema permitía un control preciso del pH y temperatura y utilizaba hasta 6 bombas peristálticas para infundir de manera continua 5 litros de medio de cultivo que circulaba con una presión y flujo controlado.

Hulsmann y colaboradores (40) desarrollaron un biorreactor modular que utilizaba la perfusión coronaria y un sistema de estimulación mecánica en tres dimensiones. Utilizando una plataforma de trabajo, el ventrículo izquierdo de ratas decelularizadas se sometía a tensión controlada utilizando un balón inflable de látex. El inflado del balón se activaba por una jeringa conectada a una bomba de infusión, mientras que una bomba de membrana aportaba volumen a frecuencias determinadas. La presión dentro del sistema estaba monitorizada. Para la perfusión, un transductor de presión y una bomba peristáltica conducían a un sistema de tubos con un colector de burbujas incorporado. Este sistema estaba implementado con un reservorio de medio de cultivo que consistía en un vaso agitador de doble camisa. El sistema disponía también de un mezclador de gases con un controlador de flujo que permitía acondicionar el medio automáticamente con aire/O₂, CO₂ y N₂ en respuesta a los cambios de pH y valores de pO₂.

En resumen, la aparición de la técnica de decelularización por perfusión hace menos de una década ha llevado a pensar que, al menos desde un punto de vista teórico, la creación de órganos bioartificiales tan complejos como el corazón es posible. Sin embargo, aunque se trata de una posibilidad teórica, la realidad es que la recelularización es un proceso mucho más complejo que la decelularización por lo que la obtención de un órgano completo con aplicación clínica parece difícil. No obstante, el enorme interés que ha despertado la bioingeniería tisular aplicada a matrices cardíacas tridimensionales en los últimos años se ha visto reflejado en una gran cantidad de trabajos en muy poco tiempo. Para una visión más global, la tabla 2 resume

los principales estudios llevados a cabo con matrices cardíacas así como los resultados de citocompatibilidad y biocompatibilidad obtenidos con los distintos tipos celulares utilizados.

Tabla 2. Principales estudios de decelularización-recelularización de matrices cardíacas y sus resultados.

Animal	Técnica Decelularización	Células	Método Sembrado	Método Cultivo	Factores añadidos	Implante de la MECd in vivo	Resultados
Rata (34)	Perfusión retrógrada coronaria 10 uM adenosina, 1% SDS; 1% Triton X-100.	50-70 x 10 ⁶ células cardíacas neonatales	5 inyecciones en VI	Biorreactor durante 28 días	Estímulo eléctrico (pulsos 10ms de 5V, inicio 24 h tras sembrado)	No, pero la matriz decelularizada se implantó para observar perfusión y función valvular	Alta densidad celular en sitios periinyección. Viabilidad > 95%. Expresión de α -actina y MYH7. Expresión de conexina 43 y vWF. Fibras contráctiles estriadas inmaduras a 8-10 d. Evidencia de respuesta eléctrica/contráctil.
		2x10 ⁷ células endoteliales de aorta (rata)	Infusión directa en aorta	Perfusión de cultivo en biorreactor; 1wk	Ninguno		Monocapa de células en vasos coronarios grandes y de pequeño tamaño. La cavidad ventricular también se reendotelizó
Cerdo (parches) (35)	Congelación (-80°C). Perfusión de 0,02% Tripsina, 0,05% EDTA, 0,05% NaN ₃ , 4% SDC	Cardiomiocitos de embriones de pollo	Parches liofilizados de MEC porcina cardíaca con 500.000 células/cm ² en la cara luminal	4 días en DMEM con 1% extracto de embrión de pollo, 10% FBS, 1% pen/strept	La MECd se esterilizó con 0,1% ácido peracético/4% etanol; y óxido de etileno	No	Los cardiomiocitos se organizaron en una estructura tipo sarcómero
Cerdo (parches 3mm grosor) (36)	1.1% NaCl, 0,02% EDTA, 0,7% NaCl-0,02% EDTA. 1% Triton X-100 y 0,1% NH ₄ OH, 70% etanol. finalmente liofilizado	Fibroblastos cardíacos de oveja en alto DMEM.	Después de liofilizados las MECd fueron rehidratadas, 5 x 10 ⁵ células pipeteadas en 10 x 10 mm de matriz	Incubación estática de los parches sembrados durante 6 semanas	Ninguno	No	Alta viabilidad celular. Remodelado de la MECd (incremento de la expresión de colágeno, GAG, MMP2 y TIMP1)
		Miocytes cardíacos neonatales de rata					Alta viabilidad celular, expresión de f-actina, conexina-43, TNNI, evidencia de uniones gap. Morfología elongada de las células, contracción espontánea pulsátil a los 2-3 días que se mantiene durante 4 semanas
		BMSCs de rata					Alta viabilidad celular

Tabla 2.Principales estudios de decelularización-recelularización de matrices cardíacas y sus resultados. (Continuación)

Rata (37)	Comparó 4 métodos de decelularización, incluyendo los métodos de Ott y Badylak y un método de combinación	Mioblastos C2C12	embrados en la superficie de las matrices	24 h de cultivo	Ninguno	No	Diferencias en cuanto a la retención de componentes de la matriz con los diferentes métodos. Ninguno es ideal. Los mioblastos sembraron todas las matrices independientemente del método usado.
Ratón (38)	Perfusión aórtica 1%SDS 10-12h. 1%Tritón X-100 durante 1 hora	Células HUES-7 ESC humanas (hESC)	3x10 ⁶ células en 100µl de medio, inyección manual en la aorta	Cultivo estático sumergido en medio acondicionado (de cardiomiocitos de rata H9c2) durante 14 días	Ninguno	Sí, implante subcutáneo de corazones cultivados durante 14 días en ratones SCID durante 6 semanas	Las células pierden sus marcadores de pluripotencialidad. Aumento de la expresión de Nkx2.5 y cTnT (expresión similar entre hESC y hMECs); Cadenas de miosina MYH6 expresadas sólo por hESC y MYL2 y MYL7 sólo expresadas por hMECs; al implantarlos, los corazones con hMSC tenían más células y mejor vascularizados; diferenciación endotelial (CD31) exclusiva de la vasculatura; no se observó contracción
		Células mesodérmicas humanas (Diferenciadas a partir de ESC) (hMSC)					
Rata (39)	Perfusión coronaria retrógrada con 1%SDS seguido de crioalmacenaje en 10% de DMSO en PBS	2x10 ⁷ células endoteliales de origen canino	Injectadas en los vasos y paredes del corazón.	Cultivo en un matraz de centrifugación modificado, con el corazón parcialmente sumergido, con recirculación del medio, 9 días de cultivo	Las matrices se almacenaron a -80º durante un año	No	Se observó adhesión de las células endoteliales a las matrices criopreservadas a los 10 días de cultivo, aglomerados celulares que sugerían proliferación de las mismas, las células se habían expandido adecuadamente en la matriz, eran viables y la MEC no resultó citotóxica.
Rata (40)	Método de combinación utilizado por Akhyari	1x10 ⁶ mioblastos C2C12 murinos in 1 ml de DMEM	10 inyecciones 100ml (100.000 células) en la pared de VI 96 h de cultivo	Biorreactor, con perfusión coronaria a 70mmHg y un balón en VI para estimulación mecánica	Previo al sembrado, la matriz fue perfundida con suero de ternera fetal para administrarle factores de crecimiento	No	Incremento de la orientación espacial de la células en la matriz formando una red alineada en comparación con cultivos estáticos

Tabla 2. Principales estudios de decelularización-recelularización de matrices cardíacas y sus resultados. (Continuación).

Cerdo (parches 20x20x3mm) (195)	Biorreactor giratorio, 0,1%SDS, 0,01% tripsina, 1mM PMFS, 20µg/ml Rnase A, 0,2mg/mlDnase durante 2,5 semanas; aplicación de ultrasonidos en periodos de 10 min. diarios	1x10 ⁶ células MSC de rata en 1 ml de L-DMEM	Inyección directa en 9 puntos del parche.	Cultivo en medio de diferenciación con azaditidina y factores de crecimiento de cardiomiocitos durante 4 días	Estimulación mecánica y/o 5V estimulación eléctrica con 1Hz de frecuencia	No	Estimulación mecánica/eléctrica incrementa la densidad celular y la supervivencia en comparación con cultivos estáticos. Se observó alineamiento celular con estímulos mecánicos. Las matrices con los 2 tipos de estímulos mostraron mayor densidad celular, alineamiento, morfología cardiomiocito-like y mayor diferenciación así como mejor comportamiento mecánico.
Ratón (41)	Congelación (-80º), Perfusión de 0,02% Tripsina, 0,05%EDTA 0,05%NaN ₃ 1%SDS/0,05% NaN ₃ , 3% Tritón X-100/0,05% EDTA/0,05% NaN ₃ , 4% ácido dexoxicólico	1 x 10 ⁷ células IPS con diferenciación cardiomiocito, músculo liso y célula endotelial) en medio de diferenciación básico. Human RUES2 ESC?	Perfundidas en la matriz a través de la aorta, cultivadas durante 16 días	Infusión periódica del medio de cultivo (no continúa, 30 minutos cada 8 h) con factores de crecimiento (VEGF, bFGF, DKK1) para facilitar diferenciación	Las matrices sembradas fueron sometidas a test farmacológico con isoproterenol y el bloqueante del componente rápido de la corriente rectificadora de K ⁺ E4031	No	Las células progenitoras de miocitos-IPS derivadas repoblaron la matriz, con contracción espontánea a los 20 días. La morfología de onda irregular en ECG demostró falta de un sistema de conducción controlado, se observó acoplamiento eléctrico celular esporádico. Se formó una monocapa celular sobre el endocardio. Se observaron estructuras músculo- like y vascular-like; expresión de marcadores cardiovasculares, y respuesta a fármacos (isoproterenol incrementó la tasa de contracción, amplitudes de Ca ²⁺ irregulares con E4031); mayor fuerza contráctil con salida de Ca ⁺² más altas
Humano (secciones 300µm) (42)	Varios métodos; Método óptimo: lisis con buffer durante 2 h, 0,5 SDS durante 6 horas con agitación, lavados con PBS y FBS 3 horas a 37º	0,5 x 10 ⁶ hMSC de cordón por cm2	Células sembradas en la superficie, el sembrado con aguja no resultó ser un método mejor	Cultivo normal estático durante 3 semanas	Para el sembrado se usaron MECd nativas.	No	Células hMSC infiltraron la matriz, la viabilidad y el metabolismo de las células era mucho mejor cuando las células crecían en la MECd que en cultivos convencionales
		Cardiomiocitos murinos derivados de iPS.			Matrices funcionalizadas con fibronectina		iPS-cardiomiocitos mostraron menos adherencia que las células CB-hMSC y no infiltraron la matriz
		Cardiomiocitos neonatales murinos			Matrices nativas y matrices con fibronectina		Mostraron buena adhesión en matrices c/s fibronectina. Se observó contracción sincrónica

Tabla 2.Principales estudios de decelularización-recelularización de matrices cardíacas y sus resultados. (Continuación).

Rata (43)	Perfusión retrógrada coronaria 1%SDS 80mmHg y 1% Tritón X-100	2-4 x 10 ⁷ células endoteliales aórticas de rata (RAES) Cardiomiocitos neonatales de rata sembradas en VI por inyección directa	Varios métodos: (1) células infundidas a través de aorta; (2) arteria braquiocefálica (AB) ; (3) vena cava inferior (VCI) y AB; (4) sólo VCI	Cultivo en biorreactor con perfusión aórtica continúa e incremento gradual de la tasa de flujo durante 3 días. Tiempo de cultivo de 7 días	Se valoró la trombogenicidad el último día de cultivo con perfusión de α -trombina humana y proteína C humana a través de la matriz recelularizada.	Sí, los corazones sembrados vía ABC se transplantaron heterotópicamente en ratas durante 7 días	La vía combinada VCI-ABC mostró la mejor celularidad en la matriz. La infusión por ABC sembró sobre todo el VI y la vía por VCI sobre todo el VD. No se observó oclusión vascular. Células eran viables, metabólicamente activas y funcionales. Los corazones recelularizados trasplantados mostraron menos trombogenicidad que las matrices acelulares control.
Cerdo (44)	Perfusión anterógrada coronaria continua a 37º de 4%SDS durante 12h, después lavados con PBS	5-6x10 ⁶ células HUVEC	Infusion coronaria, detenida 60min para facilitar adhesión celular.	Cultivo en biorreactor. El medio se cambió cada 12h. Flujo máximo 3,5 l/min. 3 semanas de cultivo	Los segmentos de miocardio sembrado se utilizaron para medir actividad eléctrica	No	células HUVEC formaron una capa sobre vasos grandes y pequeños; la recelularización fue incompleta.
		8-9x10 ⁶ cardiomiocitos neonatales de rata	5 inyecciones en VI				50% celularidad en los puntos de inyección; menos sembrado en zonas distales. Se observó actividad eléctrica (200mV)

2. Hipótesis

La técnica de decelularización por perfusión ha demostrado que es posible obtener matrices tridimensionales con unas propiedades mecánicas y una composición similar a la de la matriz extracelular cardíaca nativa. Las matrices se reendotelizan, las células maduras se contraen y las células progenitoras muestran diferenciación fenotípica hacia cardiomiocitos. Los numerosos trabajos realizados en modelos murinos se han escalado a corazones de animal grande pero los estudios en corazón humano son escasos.

La hipótesis de este trabajo es que la decelularización con detergentes iónicos (SDS) aplicada a tejidos cardíacos humanos permite crear matrices extracelulares decelularizadas que constituyen un armazón tridimensional, perfundible y citocompatible donde es posible la supervivencia y ordenación de células maduras y la supervivencia, ordenación y maduración de células progenitoras.

3. Objetivos

Los objetivos del presente estudio han sido los siguientes:

1. Obtener una matriz extracelular a partir de un corazón humano cadáver no apto para trasplante que tenga una geometría tridimensional y un árbol vascular intacto y análogo al del corazón original mediante la perfusión de un detergente iónico (SDS).
2. Caracterizar histológicamente el grado de eliminación celular y cuantificar la presencia de ADN residual en la MECd obtenida en comparación con corazones cadáver control.
3. Estudiar las propiedades mecánicas pasivas de la matriz mediante el análisis de la relación presión-volumen.
4. Comprobar la supervivencia y estudiar la ordenación de células progenitoras (células mesenquimales de médula ósea humana, hBMSC, y células progenitoras cardíacas, hCPC) y de células diferenciadas [células endoteliales de cordón (HUVEC), y cardiomiocitos HL-1 y H9c2] sembradas y cultivadas en dos estructuras cardíacas humanas decelularizadas: parches de ventrículo izquierdo y válvula aórtica.
5. Analizar, mediante la cuantificación de la expresión de genes cardíacos, la influencia de la matriz en la diferenciación de células progenitoras cardíacas, (hCPC).
6. Estudiar el acoplamiento eléctrico de los cardiomiocitos y de las células progenitoras (hBMSC y hCPC) en la matriz.

4. Material y métodos

4.1 Obtención de corazones procedentes de donantes cadáver

Para el presente trabajo hemos utilizado 52 corazones humanos procedentes de donantes cadáver que la Organización Nacional de Trasplante (ONT) consideró no válidos para trasplante en el período comprendido entre mayo de 2010 y junio de 2013. Para el proyecto se obtuvo la aprobación del comité ético del Hospital General Universitario Gregorio Marañón así como la autorización y aprobación de la ONT. Todos los familiares de los donantes recibieron un consentimiento informado en el que se explicaba que el corazón donado sería utilizado para este proyecto de investigación.

Los corazones utilizados se extrajeron tras obtener el consentimiento informado y después de que otros órganos aptos para trasplante fueran extraídos del donante.

La extracción se hizo utilizando los protocolos habituales. Mediante esternotomía media se expone el mediastino anterior, se abre el pericardio y se procede a la disección de las arterias pulmonares en la porción próxima a su salida del ventrículo derecho, las venas pulmonares en la porción más próxima a su entrada a la aurícula izquierda, la arteria aorta en su porción ascendente, a unos 4 cm de su salida del ventrículo izquierdo y por último, las venas cavas justo antes de su entrada a la aurícula derecha. Tras ello, el corazón queda liberado y puede extraerse íntegramente.

Los corazones se mantuvieron en cardioplejia ó solución salina a 4°C hasta que realizamos la técnica de decelularización entre el día 1 y día 5 post extracción.

4.2. Decelularización de corazones

4.2.1. Técnica de decelularización

Para eliminar las células del corazón y obtener así una MECd cardíaca adaptamos el protocolo de decelularización por perfusión previamente descrito para corazones de murino por el grupo de trabajo de Ott y Taylor (34). La técnica descrita en este trabajo demostró una alta eficiencia en cuanto a la eliminación de componentes celulares con una adecuada preservación de los componentes de la matriz extracelular obtenida.

Los corazones se canularon a través de la aorta ascendente, perfundiendo por vía anterógrada a través de las arterias coronarias una perfusión de SDS 1% en agua deionizada a temperatura ambiente. La solución de perfusión provenía de un tanque individual, el cual estaba conectado a la bomba de presión mediante un circuito cerrado. La presión de perfusión

se mantuvo a aproximadamente 80–100mmHg durante un período comprendido entre 4 y 8 días. (Ver representación esquemática en la Figura 5). A lo largo del proceso de decelularización estos tanques requirieron ser cambiados entre 4 y 6 veces. Los corazones se lavaron con aproximadamente 20 litros de PBS para completar el proceso y eliminar los restos de detergente. Finalmente, para evitar colonizaciones microbiológicas, se lavaron con ácido peracético.

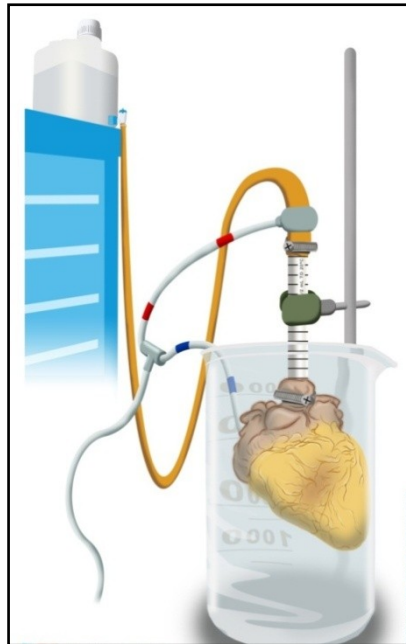


Figura 5. Esquema que muestra la posición del corazón durante el proceso de decelularización. Por vía anterógrada aórtica se perfunde la solución de SDS 1% con una presión fisiológica en torno a 80-100mmHg. (Autor: Jesús Romero, Unidad de Fotografía del HGU Gregorio Marañón, Madrid).

Para determinar el grado de eliminación celular y valorar la retención de parénquima y estructuras vasculares analizamos:

1. La estructura macroscópica de los corazones decelularizados y el árbol coronario mediante endoscopia, ecocardiografía, angiografía vascular y tomografía óptica coherente (OCT).
2. La histología y ultraestructura de la matriz con hematoxilina-eosina (H&E), tricrómico de Masson, tinción argéntica y microscopía electrónica
3. La funcionalidad del sistema vascular mediante técnicas de perfusión vascular.
4. La funcionalidad de la MECd obtenida mediante el análisis de sus propiedades mecánicas pasivas.

Trece corazones no fueron decelularizados y sirvieron como controles cadáver.

4.2.2. Análisis de la estructura macroscópica de la matriz

Las características anatómicas de las cavidades cardíacas y válvulas del corazón decelularizado se evaluaron con inspección visual, con endoscopia (fibrobroncoscopio Pentax CK 1570) y ecocardiografía transtorácica. (Modelo General Electric Vivid 7).

Para la endoscopia, se utilizó como acceso la aorta ascendente para visualizar la válvula aórtica (VA), el ventrículo izquierdo (VI), la válvula mitral (VM) y la aurícula izquierda (AI). Vía arteria pulmonar se visualizó el ventrículo derecho (VD), la válvula tricúspide (VT), y la aurícula derecha (AD).

Para el estudio ecocardiográfico la matriz se sumergió en agua deionizada ya que ésta sirve como interfase acústica. Obtuvimos imágenes desde el epicardio con un transductor de banda ancha de 14MHz. Para valorar la competencia de las válvulas aurículoventriculares infundimos suero salino a ambos ventrículos utilizando jeringas de 60ml a través de una vaina intravascular de 5 French que estaba insertada en las válvulas aórtica y pulmonar, a su vez herméticamente cerradas. Modificamos la sístole y diástole ventricular por aspiración e inyección de suero salino a través de la jeringa y compresión externa manual de la matriz. (Figura 6).

La anatomía de los vasos sanguíneos decelularizados se visualizó con angiografía coronaria. El procedimiento se realizó vía coronaria izquierda y derecha utilizando un catéter convencional de 6 French. Se realizó además OCT de la arteria descendente anterior (DA) con una unidad de interfase. (C-7 System, LightLab Imaging Inc., Westford, MA, USA). Sobre una guía convencional para arterias coronarias (0.014-inch), se introdujo un catéter de 2.7 French. Se obtuvieron imágenes desde la DA distal a proximal utilizando pullback automático a una velocidad de 20 mm por segundo. Las imágenes con OCT se tomaron a 100 frames por segundo.

La integridad de la vasculatura nativa de la matriz se valoró con ecocardiografía con suero salino agitado y con líquido hemático. Se empleó una infusión de suero salino agitado (20 ml) en el tronco coronario izquierdo cateterizado para visualizar la integridad de la microvasculatura. A continuación, se infundió líquido hemático para valorar la integridad de los vasos epicárdicos y la retención de la perfusión en la microvasculatura de la matriz.

Finalmente se valoró la anatomía macroscópica en cortes sagitales del corazón decelularizado antes de hacer el análisis histológico.

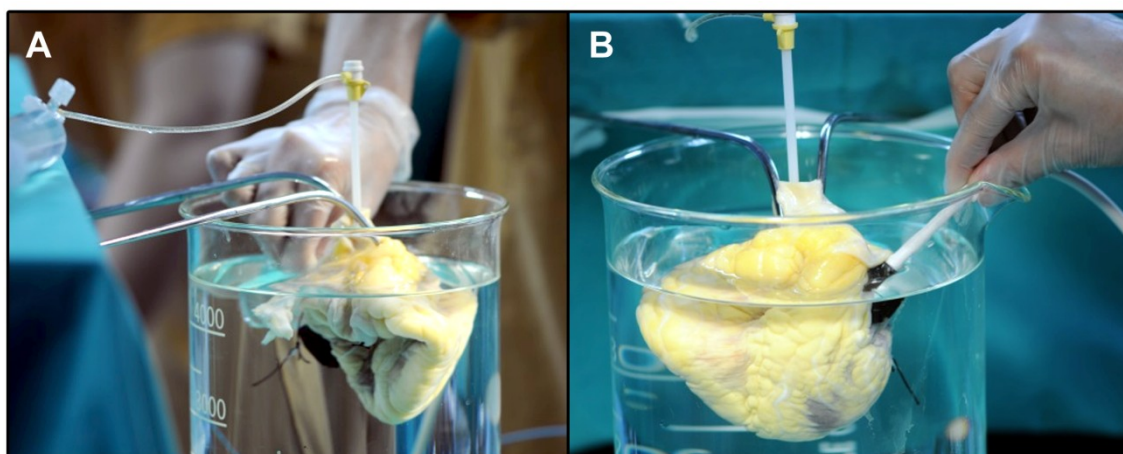


Figura 6. Evaluación de la competencia valvular de las válvulas mitral y tricúspide en sístole (panel A) y en diástole (panel B) a través de ecocardiografía epicárdica.

4.2.3. Análisis histológico y ultraestructural

Tomamos de cada matriz sistemáticamente 16 muestras triples, correspondientes a ventrículo derecho (VD), ventrículo izquierdo (VI), septo interventricular derecho (SIVd), septo interventricular izquierdo (SIVi), aurícula derecha (AD), aurícula izquierda (AI), ostium coronario izquierdo (OCI), válvula aórtica (VAO), válvula pulmonar (VP), válvula mitral (VM), válvula tricúspide (VT), aorta ascendente (AA), arteria pulmonar (AP), músculo papilar (MP), seno coronario (SC) y arteria coronaria (circunfleja o descendente anterior). Dos muestras se utilizaron para análisis histológico (micro y ultraestructural) y la tercera para cuantificación de ADN residual.

Para evaluar la integridad estructural de la matriz y documentar la eliminación de las células, examinamos los corazones decelularizados con microscopio óptico, con microscopía electrónica y con Microscopio Confocal.

Para el análisis histológico, las muestras de corazones decelularizados y no decelularizados se fijaron con formalina al 10%, se embebieron en parafina y se obtuvieron cortes de 10µm de sección que se tiñeron con H&E, tricrómico de Masson y tinción argéntica. Para valorar la integridad y composición de la MECd fijamos las muestras con anticuerpos anti colágeno tipo I, colágeno tipo IV y elastina (Roche Diagnostics). Los cortes se visualizaron con un microscopio óptico Leica DMD 108.

Para el análisis ultraestructural, muestras de corazón decelularizado y muestras control se fijaron en glutaraldehído 2.5% durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se

lavaron con PBS. Para el análisis con microscopía electrónica de barrido (SEM), las muestras fueron post fijadas con tetróxido de osmio al 1% un mínimo de 2 horas y a continuación deshidratadas con concentraciones crecientes de acetona, aumentando progresivamente la concentración de la misma de un 50% hasta el 100% en pases de 1 hora. Posteriormente las muestras fueron secadas en la unidad de desecación (proceso automático de unos 45 minutos). Finalmente a las muestras se les dio un baño de oro durante 5 minutos en el *sputtering* (unidad de sombreado). Con ello conseguimos hacer a la muestra conductora. Para la visualización de las muestras se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-T300. Para el microscopio electrónico de transmisión (TEM), el tejido sólido se cortó en bloques de 1 mm³; los bloques se postfijaron con tetróxido de osmio y se tiñeron con acetato de uranilo seguido de citrato de plomo, se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y se embebieron en resina. Con el microtomo se obtuvieron cortes de los bloques con un cuchillo de cristal. Los cortes semifinos se fijaron con azul de metileno para su visualización con el microscopio de campo brillante. Los cortes ultrafinos (aproximadamente 80 nanómetros) se visualizaron con un microscopio JEOL 100 SX. También obtuvimos imágenes de muestras decelularizadas teñidas con DAPI con microscopía Confocal utilizando para ello un microscopio de epifluorescencia invertida Ultra-spectral Leica TCS-SP2-AOBS.

4.2.4. Cuantificación de ADN residual

Finalmente, para terminar de documentar la eliminación de los componentes nucleares de la MECd, cuantificamos la concentración de ADN de la matriz y de tejido de corazón cadáver usado como control. Para ello purificamos el ADN de muestras de entre 25 a 50 mg de tejido control y de matriz utilizando un kit comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics). La concentración de ADN se estimó midiendo la absorbancia a 260nm con un espectrofotómetro. (Nanophotometer Pearl, IMPLEN).

4.2.5. Análisis de las propiedades pasivas mecánicas de la matriz

Las propiedades diastólicas pasivas de los ventrículos están determinadas por sus componentes celulares y extracelulares, así como la configuración tridimensional de ambos componentes. Para determinar las propiedades mecánicas de la MECd exclusivamente, sin el componente celular, estudiamos la relación pasiva presión- volumen (PV) del ventrículo izquierdo y derecho en 8 corazones humanos antes y después de ser decelularizados.

Para ello, se suturaron los velos de la válvula mitral y tricúspide en una posición cerrada y a través de la válvula aórtica y pulmonar se introdujeron balones de polietileno no compliantes herméticamente unidos a una vaina intravascular de 5 French. Un micromanómetro de alta fidelidad de 5 French (Millar-Instruments) se colocó dentro del balón y se conectó a un colector de 3 puertos. (Figura 6, paneles A-D).

Modificamos la presión y volumen por aspiración, seguido de una inyección lenta de suero salino isotónico con jeringas de 60ml conectadas al colector. (Figura 6, panel E). Los corazones control y las matrices decelularizadas estaban suspendidas en un soporte de anillo y sumergidas en un baño salino a 36°C. Para obtener la presión transmural de las cavidades, colocamos un segundo catéter micromanómetro en el baño salino, a la misma profundidad que el sensor intraventricular.

Los datos de presión se adquirieron digitalmente de manera continua a 1000 Hz y el volumen inyectado era registrado a intervalos de 1 ml a medida que el suero salino era inyectado desde la jeringa hasta un pico de presión de 30mmHg. El volumen final intra balón se consideró el total del volumen infundido. Las medidas para el ventrículo derecho e izquierdo se obtuvieron separadamente en el momento en que el ventrículo contralateral estaba vacío. Al final del experimento, se constató un valor constante de presión transmural cero dentro de cada bolsa para el rango de volúmenes explorado.

Aplicamos el ajuste exponencial al análisis de la relación PV según se indica en la fórmula:

$$P = a + be^{c(V-V_0)}$$

En esta ecuación, a es la asíntota de presión, b y c son coeficientes propios del material, y V_0 es el volumen de equilibrio. La principal limitación de esta aproximación es que la rigidez de la cámara (dP/dV) es una función del volumen, y por tanto, una función del tamaño del

ventrículo; es decir, no es simplemente una propiedad del material. Para resolver este inconveniente, calculamos la pendiente de la curva ajustada en el volumen equilibrio como un parámetro de rigidez para comparar entre muestras.

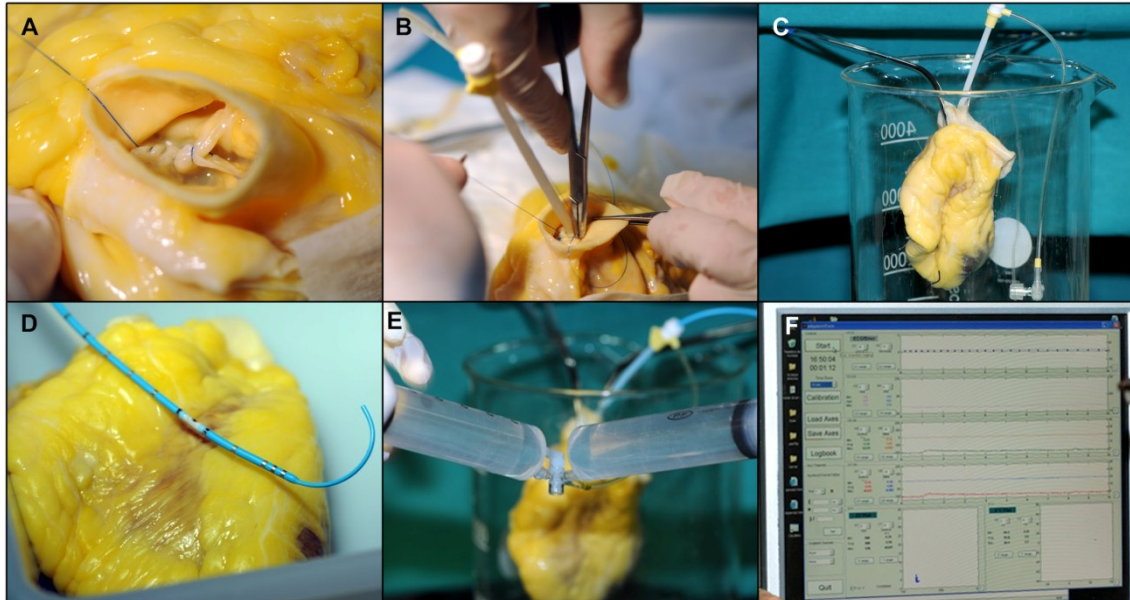


Figura 7. Experimento utilizado para la medición de las propiedades pasivas mecánicas de la matriz. Las válvulas de la MECd se suturan en una posición cerrada. A través de la válvula aórtica ó pulmonar se introduce una vaina intravascular de 5 French con un balón de polietileno no compliante y un micromanómetro de alta fidelidad (Panel D) en su interior. Los datos de presión se adquirieron digitalmente de manera continua. (Panel F).

4.3. Citocompatibilidad de parches de ventrículo y válvula aórtica

Para valorar la citocompatibilidad de la matriz utilizamos dos tipos de aproximaciones: por un lado sembramos y cultivamos células en parches de ventrículo izquierdo decelularizado y sobre válvulas aórticas decelularizadas.

4.3.1 Líneas celulares utilizadas

Hemos utilizado 5 líneas celulares distintas para este trabajo:

1. Células progenitoras cardíacas humanas c-Kit⁺ (hCPCs) (donadas por Coretherapix, Madrid). Estas células se obtienen de especímenes de biopsia cardíaca humana siguiendo el procedimiento descrito por Messina y colaboradores (248).
2. Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana (hBMSCs) (donadas por la Unidad de Producción Celular, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IiSGM), Madrid). Las muestras de médula ósea se obtuvieron del aspirado de cresta ilíaca de sujetos

sanos y las hMSC se aislaron, purificaron y se expandieron de acuerdo con los protocolos habituales (249).

3. Células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVECs) (ATTC, Reino Unido).
4. Cardiomiocitos de rata H9C2 (ATCC, Reino Unido).
5. Cardiomiocitos HL-1 (donados por el Dr. William C. Claycomb, Louisiana State University Medical Center, New Orleans, USA)

Todas las líneas celulares se pre – marcaron con 5uM de Dil (octadecilo (C₁₈)-indocarbocianina) para su posterior visualización con microscopio de fluorescencia. Dil es un colorante de carbocianina muy lipofílico que se disuelve y difunde a través de la membrana citoplasmática de las células vivas. Bajo el microscopio emite fluorescencia roja cuando se excita con luz verde. Una vez fijadas las células se marcaron con DAPI, un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones con Timina y Adenina en secuencias de ADN permitiendo la visualización de los núcleos celulares de un color azul intenso bajo luz ultravioleta.

4.3.2. Recelularización de matrices de válvula aórtica

A partir de la MECd obtenida con la técnica descrita en 4.2.1, obtuvimos matrices de válvula aórtica decelularizada. Una vez disecada la válvula, separamos los 3 velos valvulares de manera independiente. Preparamos una placa (*Falcon, bd*) de 6 pocillos con 6 *insert* de cultivo (*Corning*) y en cada una de ellos se colocaron varias secciones de los velos valvulares por su cara aórtica y ventricular. Sobre cada uno de ellos se sembraron 300.000 células HUVEC y 300.000 células hBMSC. (Figuras 8 y 9). Obtuvimos cortes para su visualización con microscopía óptica y Confocal a las 48 h y 6 días.

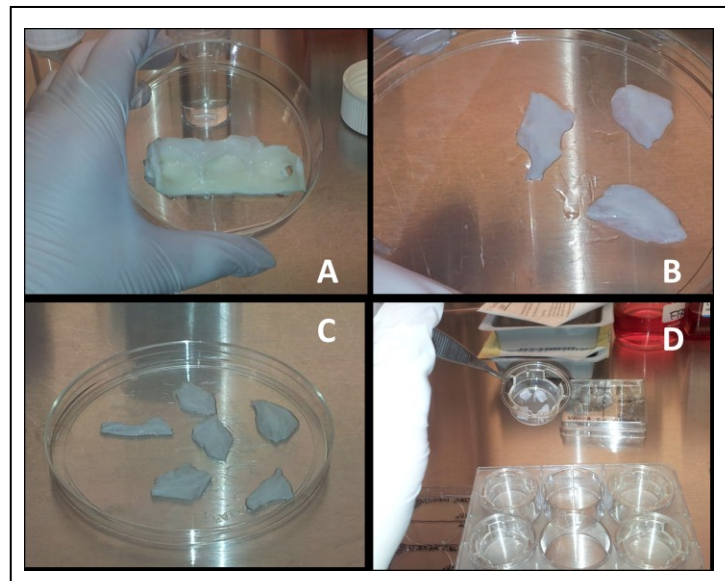


Figura 8. Válvula aórtica decelularizada disecada, los 3 velos aórticos por separado colocados en placas *insert* para el sembrado celular. (Paneles A, B, C y D respectivamente).

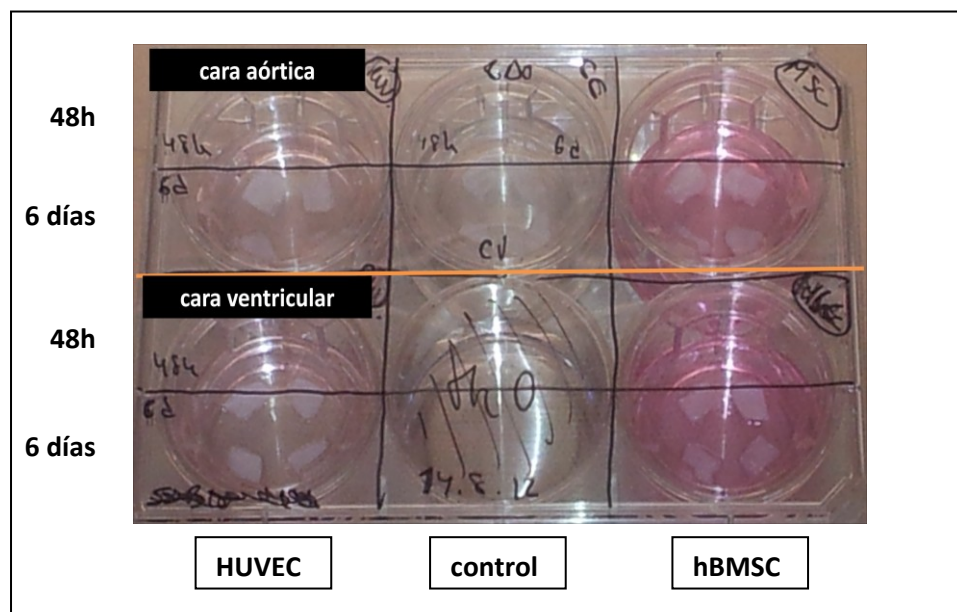


Figura 9. Citocompatibilidad de células HUVEC y hBMSC en secciones de válvula aórtica decelularizada. Cada disco contiene 4 fragmentos en los que se sembraron 300.000 células en cada uno de ellos. Los resultados se observaron a las 48 h y a los 6 días con microscopía óptica y Confocal.

4.3.3. Recelularización de la matriz extracelular *in vitro*

Todos los tipos celulares (hCPCs, hBMSCs, HUVECs, H9c2 y HL-1) se cultivaron en parche de ventrículo izquierdo humano decelularizado durante 21 días. Las células se sembraron en tres concentraciones distintas (5×10^4 , 10×10^4 , y 30×10^4 células) en 20 μ l de medio de cultivo.

Las células hCPC se cultivaron en el medio de cultivo F12-HAM suplementado con un 10% de FBS, 1% PS (penicilina-streptomina), 1% PSA y 1% ITS 1X (insulina-transferrina-selenio). Las células hBMSC se cultivaron en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con 1% PS. Los cardiomiocitos HL-1 se cultivaron en medio Claycomb con 1% L-Glutamina, 1% PS y 1% NE (norepinefrina). Para los cardiomiocitos H9c2 se utilizó el medio DMEM alto glucosa (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* 4.5g/L glucose) con 1% PS. Para las células HUVEC se utilizó el medio F12K con 1% PS, 1 ml de heparina y 1 ml de ECGS (0.05 mg/ml) (*Endothelial Cell Growth Supplement*).

En todos los casos el medio se suplementó con un 10% de PBS sobre el tejido decelularizado. Tras 2 h de incubación a 37° con un 5% CO₂, añadimos 1-2ml de medio de cultivo e incrementamos el volumen después de 24 h para cubrir la matriz. El medio de cultivo se renovaba cada 2-3 días hasta los 21 días de duración total del experimento. Se obtuvieron cortes histológicos al 1er, 5 y 21 días.

4.3.4. Caracterización de la expresión génica en células c kit + hCPC

Para analizar el posible efecto de la MECd sobre la diferenciación de las células progenitoras residentes cardíacas hCPC estudiamos la expresión de varios genes cardíacos a los 21 días de cultivo y lo comparamos en paralelo con la diferenciación obtenida en cultivos 2D convencionales. La técnica utilizada para el análisis fue la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa ó en tiempo real, en su variante con proceso de transcripción inversa previo (Reverse Transcription) ya que partimos del ARN mensajero (ARNm) presente en las células. (Técnica conocida con el acrónimo RT-qPCR).

En primer lugar, las cadenas de ADN complementario (ADNc) necesarias para la reacción fueron sintetizadas a partir de 1 μ g de ARN total con el kit de Transcriptasa Inversa de Alta Capacidad de cDNA (*Applied Biosystems*). A continuación, los genes de interés (tabla 3) se midieron por PCR cuantitativa utilizando para la detección y cuantificación de ADN el reactante fluorescente inespecífico SYBR Green (*de Applied Biosystems*). Las condiciones de ciclo fueron

95º durante 10 minutos, seguidas de 40 ciclos de 95º durante 15 segundos y 60ºC durante 1 minuto.

La expresión de los genes de interés en las células cultivadas la cuantificamos de manera relativa utilizando para ello como gen de referencia el gen GusB, cuya expresión génica no se modifica.

Tabla 3. Primers utilizados para valorar la expresión de genes de músculo cardíaco en hCPCs cultivadas en la MECd humana durante 21 días.

Gen	Sentido	Anti-Sentido
bMHC	5'-GCTGGGGCTGATGCGCTAT-3'	5'-TGGGGATGGGTGGAGCGCAA-3'
cActina	5'-GACGAGGAGACCACCGCCCT-3'	5'-ACCATAACTCCCTGGTGCCGC-3'
GATA4	5'-AGCAGCTTCTGCGCTGTGG-3'	5'-TGGGGGCAGAAGACGGAGGG-3'
MEF2C	5'- TCCTGCAAATATGGCCCTAG-3'	5'- CCTGACACACCGGGATTGTT-3'
Nkx2.5	5'-TCACCGGCCAAGTGTGCGTC-3'	5'-GCAGCGCGCACAGCTCTTTC-3'
Troponina T	5'-GGAGCAGGAAGAAGCAGCTGTTGA-3'	5'-TTCTGCCCTGGTCTCCTCGGTC-3'
GusB	5'-CAACGAGCCTGCGTCCCACC-3'	5'-ACGGAGCCCCCTTGCTGCT-3'

4.3.5. Metodología del estudio de acoplamiento eléctrico celular

La presencia de acoplamiento eléctrico intercelular de las células sembradas en la matriz se valoró con técnicas de mapeo óptico y mediante la expresión de conexina 43. Los sistemas de mapeo óptico proporcionan una imagen de la actividad eléctrica celular. Se fundamentan en la utilización de tintes fluorescentes sensibles al voltaje que se adhieren a la membrana celular, o de moléculas denominadas “indicadores de calcio”. Los indicadores de calcio son moléculas que responden a la unión de Ca^{2+} cambiando sus propiedades espectrales siendo posible cuantificar de este modo la concentración intracelular de calcio iónico. El acceso de los indicadores de calcio al interior celular se lleva a cabo mediante sus formas esterificadas, que al ser hidrofóbicas atraviesan fácilmente la membrana celular. Una vez en el citosol los enlaces éster son hidrolizados por esterasas intracelulares quedando atrapado el fluoróforo en el interior de la célula. La frecuencia de emisión de luz de estos tintes fluorescentes varía de forma proporcional a la variación del voltaje transmembrana. Mediante cámaras de alta resolución (espacial y temporal), se registra directamente en múltiples localizaciones el potencial de acción

cardíaco. De esta forma, se obtiene una imagen bidimensional (píxel x píxel) de la actividad eléctrica cardíaca.

El potencial de acción registrado en cada píxel representa el voltaje transmembrana promedio de la región espacial captada bajo su campo de visión. En función de la resolución, el campo de visión puede hacerse mayor o menor, y con ello es posible registrar la actividad eléctrica a nivel de una sola célula.

En nuestro estudio fijamos las células de la matriz por inmersión en el medio de cultivo Claycomb con el indicador de calcio fluoróforo Rhod-2AM (*TEFLabs, Inc, Austin, TX, USA*) disuelto en DMSO (1mM de solución stock; 3.3 μ l por ml en medio de cultivo) y Probenecid (*TEFLabs, Inc, Austin, TX, USA*) durante 30 minutos bajo condiciones de cultivo. Después de la tinción, el medio de cultivo se cambió por una solución fresca de Krebs modificada a 36.5°C (contiene en mM: NaCl, 120; NaHCO₃, 25; CaCl₂, 1.8; KCl, 5.4; MgCl₂, 1; glucosa, 5.5; H₂O₄PNa•H₂O, 1.2).

Para excitar Rhod-2AM, iluminamos la matriz recelularizada con luz LED verde filtrada; [LED CBT-90-G (pico de potencia de salida 58 W, longitud de onda 524 nm, de Luminus Devices, Billerica, USA)] con lentes plano-convexas (LA1951; distancia focal =25,4 mm; Thorlabs, New Jersey, USA) y un filtro de excitación verde. (D540/25X; Chroma Technology, Bellows Falls, USA). Las dos fuentes de luz se utilizaron para alcanzar una iluminación homogénea.

La fluorescencia se registró con una cámara Evolve-128 EMCCD (del inglés *Electron-Multiplying Charge Coupled Device*) (*Photometrics, Tucson, AZ, USA*) con un filtro de emisión (ET585/50-800/200M; Chroma Technology) válido para Rhod-2AM situado frente a una cámara con lentes de alta velocidad (DO-2595; Navitar Inc., Rochester, USA).

Los constructos celulares se estimularon a 1 Hz usando un pulso bipolar de 2ms. Para estimar los tiempos de activación y construir mapas de propagación se utilizó un software escrito en MATLAB (Math Works).

Para verificar el acoplamiento eléctrico, las células sobre la matriz se fijaron con PBS con paraformaldehído 4% (PFA) y se embebieron en parafina. Se obtuvieron cortes de 4-5 μ m y se permeabilizaron con 0.25% Triton X-100. Posteriormente los cortes fueron incubados con un anticuerpo primario anti-conexina 43 (*dilución 1:75; Sigma Aldrich*), durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS. Finalmente se hizo un

segundo marcaje durante 30 minutos con anticuerpos marcados con FITC (isotiocianato de fluoresceína) (*dilución 1:100; Bethyl*). Los núcleos fueron visualizados con fijación DAPI (*Sigma Aldrich*). La matriz recelularizada e inmunomarcada se analizó con un microscopio Leica DM3000 (*Leica Microsystems*).

5. Resultados

5.1. Valoración de la matriz cardíaca extracelular decelularizada

5.1.1. Integridad estructural macroscópica

Las características de los donantes, el peso de los 39 corazones decelularizados y los 13 órganos utilizados como control así como los tiempos de decelularización se muestran en la tabla 4. Los corazones se almacenaron a 4º en suero salino durante un máximo de 5 días antes del proceso de decelularización sin observar por ello efectos deletéreos en la matriz resultante final. Los órganos con un peso comprendido entre 250 y 750 gramos se decelularizaron en unos 4 días aproximadamente; incrementar el tiempo del proceso hasta 8 días no supuso ningún beneficio extra evidente, incluso en los corazones más grandes.

Observamos que el proceso de decelularización comienza en las zonas anatómicas más finas (grandes vasos y pared de aurículas) y continúa por zonas intermedias (ventrículo derecho, válvulas) hasta las regiones cardíacas más gruesas como el ventrículo izquierdo y el septo interventricular. Durante el proceso, se produce una pérdida progresiva del color de los grandes vasos y músculo cardíaco obteniendo alrededor del 4º día una matriz o armazón de aspecto traslúcido. Esta matriz mantiene la forma del corazón y aproximadamente el 85% de la masa original del órgano. (Figura 10).

Para evaluar el corazón decelularizado *in situ* antes de diseccionarlo utilizamos varias técnicas. Mediante endoscopia comprobamos la integridad macroscópica de las válvulas sigmoideas y aurículoventriculares, de las cuatro cavidades cardíacas, músculos papilares, e incluso de las estructuras más finas del aparato subvalvular como las cuerdas tendinosas. (Figura 11, fila superior). Las zonas que observamos de color marrón resultaron ser depósitos de lipofuchina en el examen histológico. Con ecocardiografía observamos que la matriz conserva el alineamiento circunferencial normal de las fibras miocárdicas a lo largo de la pared ventricular (Figura 11, fila inferior) así como la competencia de las válvulas sigmoideas y aurículoventriculares al comprimir extrínsecamente la MECd.

La disección de la matriz nos permitió observar que el corazón decelularizado tenía macroscópicamente un color más claro que los controles así como la confirmación de que la matriz conserva macroscópicamente todas las estructuras internas del órgano, incluidas las más finas. (Figura 12).

Tabla 4. Características de los donantes y tiempos del proceso de decelularización.

Sexo	Edad (años)	Pcorazón(g)	PMECd(g)	T hasta inicio proceso decel.	Tiempo decelularizacion(d)
Hombre	50	558	452	9 horas	4
Hombre	73	466	436	12 horas	7
Mujer	58	332	224	24 horas	4
Mujer	50	369	292	24 horas	7
Hombre	80	398	327	24 horas	7
Mujer	67	488	457	24 horas	8
Mujer	87	358	Control	Control	Control
Mujer	35	267	Control	Control	Control
Mujer	54	587	522	9 días	7
Hombre	59	550	500	13 días	8
Hombre	49	380	351	8 días	4
Hombre	76	343	288	24 horas	4
Mujer	68	526	432	3 días	5
Mujer	65	314	283	3 días	4
Mujer	17	231	189	8 horas	5
Hombre	57	671	657	5 horas	5
Hombre	66	435	344	24 horas	4
Hombre	61	512	Control	Control	Control
Hombre	41	398	Control	Control	Control
Hombre	41	680	572	12 horas	7
Mujer	72	284	Control	Control	Control
Hombre	43	353	300	24 horas	4
Hombre	58	376	331	4 días	4
Hombre	59	432	376	24 horas	4
Hombre	57	326	Control	Control	Control
Hombre	46	358	Control	Control	Control
Hombre	30	291	Control	Control	Control
Hombre	78	298	Control	Control	Control
Hombre	70	644	528	10 horas	6
Hombre	78	430	354	5 días	4
Hombre	55	252	214	12 horas	7
Mujer	32	271	171	12 horas	3
Hombre	56	303	249	2 días	7
Mujer	60	404	334	60 horas	5
Mujer	66	335	Control	Control	Control
Mujer	80	464	361	12 horas	7
Hombre	58	419	279	10 horas	6
Hombre	73	515	439	12 horas	4
Hombre	52	457	435	18 horas	8
Hombre	70	464	393	12 horas	8
Hombre	52	565	373	24 horas	6
Hombre	54	362	Control	Control	Control
Hombre	59	410	Control	Control	Control
Hombre	67	373	306	12 horas	8
Mujer	64	305	244	12 horas	8
Mujer	64	321	238	18 horas	8

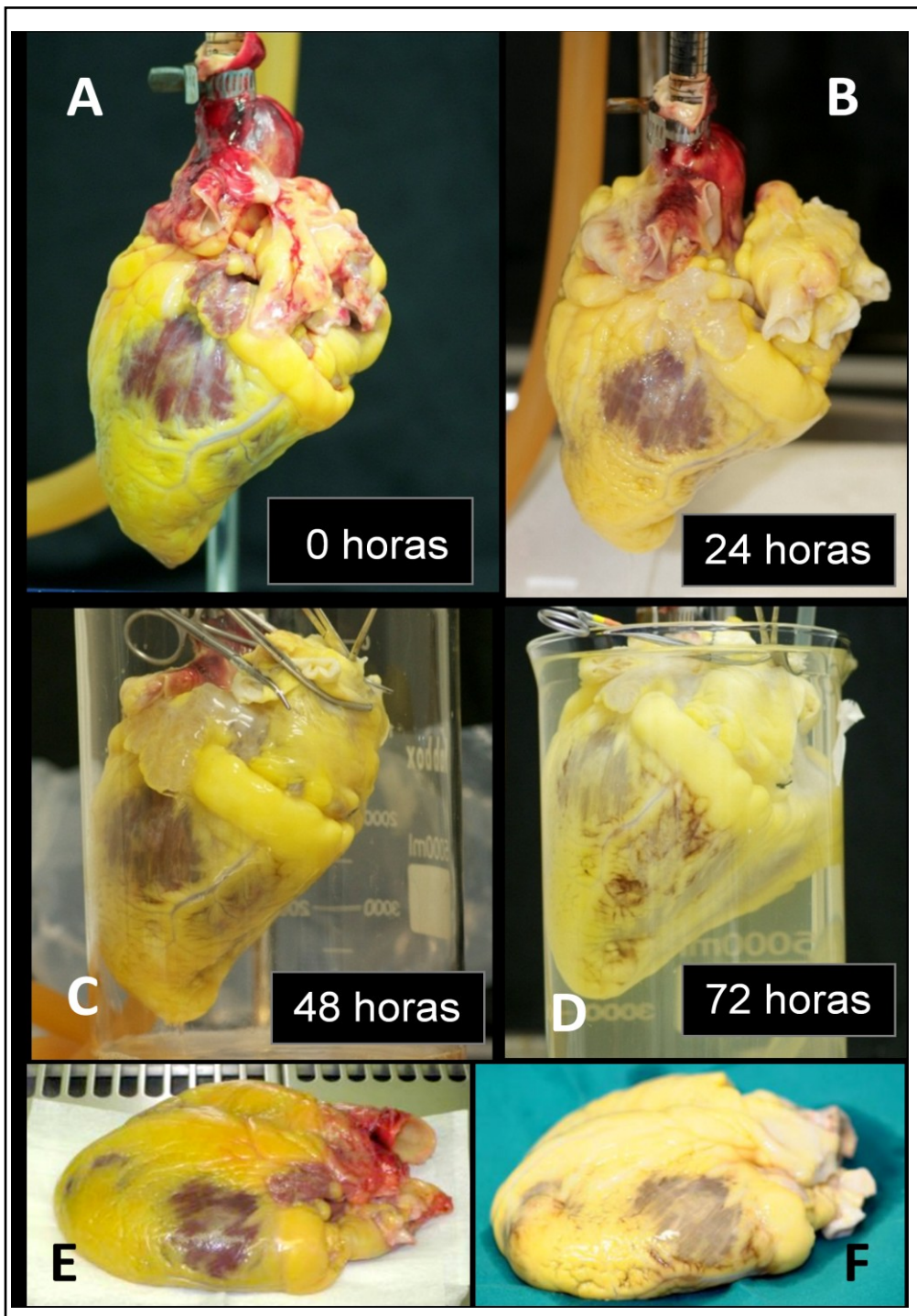


Figura 10. Aspecto macroscópico externo de un corazón humano durante el proceso de decelularización. El órgano adquiere un aspecto traslúcido de manera progresiva, (paneles A-D) comenzando por las regiones cardíacas más finas. La forma macroscópica del corazón original (Panel E) se mantiene tras 96 horas de decelularización. (Panel F).

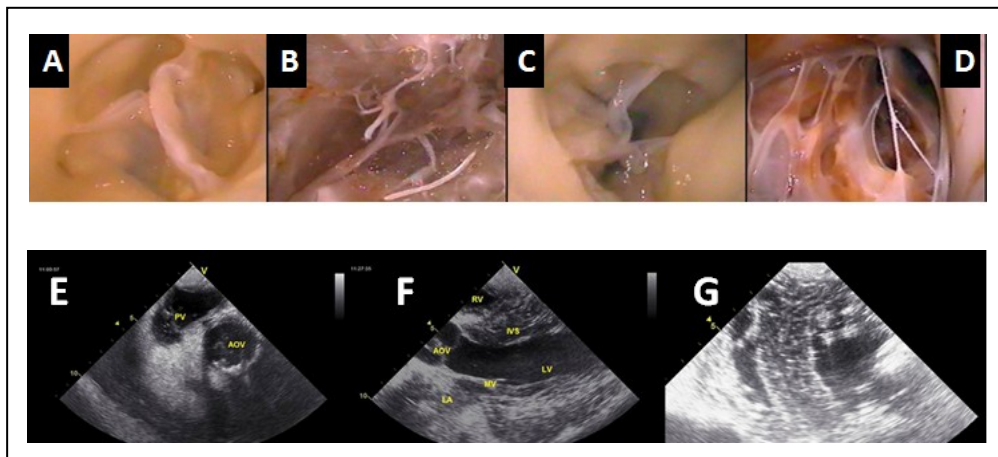


Figura 11. Integridad estructural de la MECd. Fila superior. Endoscopia de la matriz mostrando la integridad de la válvula aórtica (Panel A), ventrículo izquierdo con músculos papilares y cuerdas tendinosas (Panel B), válvula pulmonar, (Panel C), y trabéculas del ventrículo derecho. (Panel D). Fila inferior, paneles E-G. Ecocardiografía demostrando la integridad de la válvula pulmonar (PV), válvula aórtica (AOV), válvula mitral (MV), aurícula izquierda (LA), ventrículo izquierdo (LV), septo interventricular (IVS), y ventrículo derecho (RV) y disposición normal circunferencial de las fibras miocárdicas.

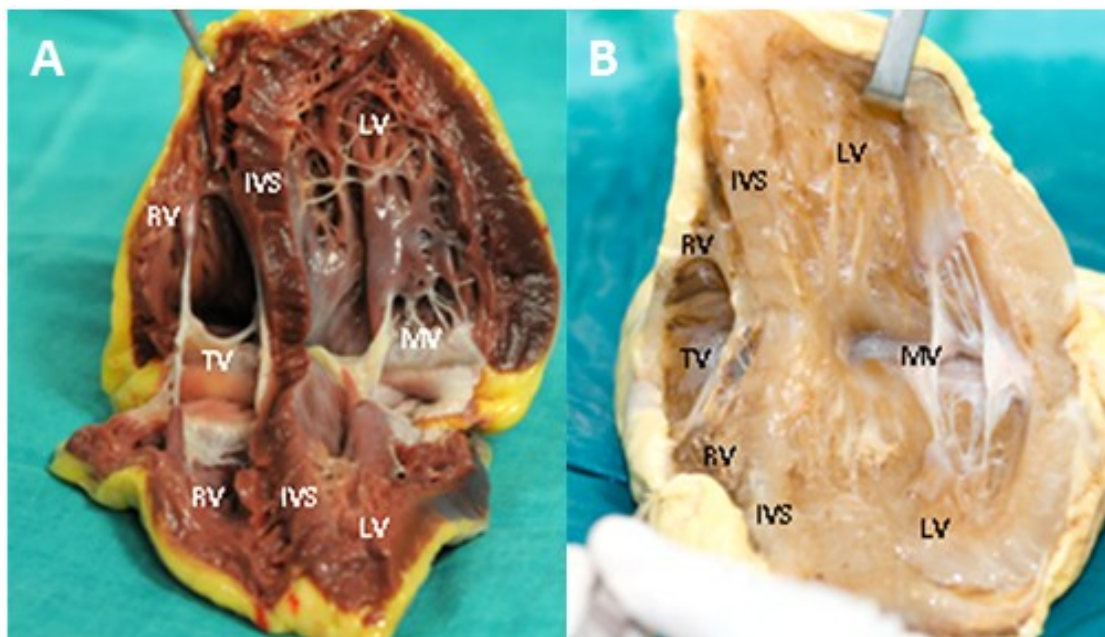


Figura 12. Anatomía macroscópica tridimensional de un corazón humano no decelularizado utilizado como control (Panel A) y de una matriz cardíaca decelularizada (Panel B) abiertos en un plano sagital o horizontal longitudinal mostrando el ventrículo izquierdo (LV) y ventrículo derecho (RV) separados del septo interventricular (IVS) y ambas válvulas auriculoventriculares (válvula mitral [MV] y válvula tricúspide [TV]).

5.1.2. Eliminación celular y conservación estructural de la matriz

En comparación con los corazones control, en el examen histológico de las cavidades, grandes vasos y válvulas de la matriz con H&E se observó la pérdida de los componentes celulares incluyendo núcleos y componentes citoplasmáticos como se muestra en las imágenes de la aorta ascendente, el septo interventricular, las válvulas sigmoideas y las válvulas aurículoventriculares de las figuras 13 y 14. Las muestras de válvula pulmonar y septo interventricular son especialmente representativas de las zonas más difíciles de decelularización. El septo interventricular es la estructura más gruesa y muscular del corazón. La válvula pulmonar representa la parte derecha del corazón, que es más difícil de decelularizar por vía coronaria anterógrada a través de la aorta.

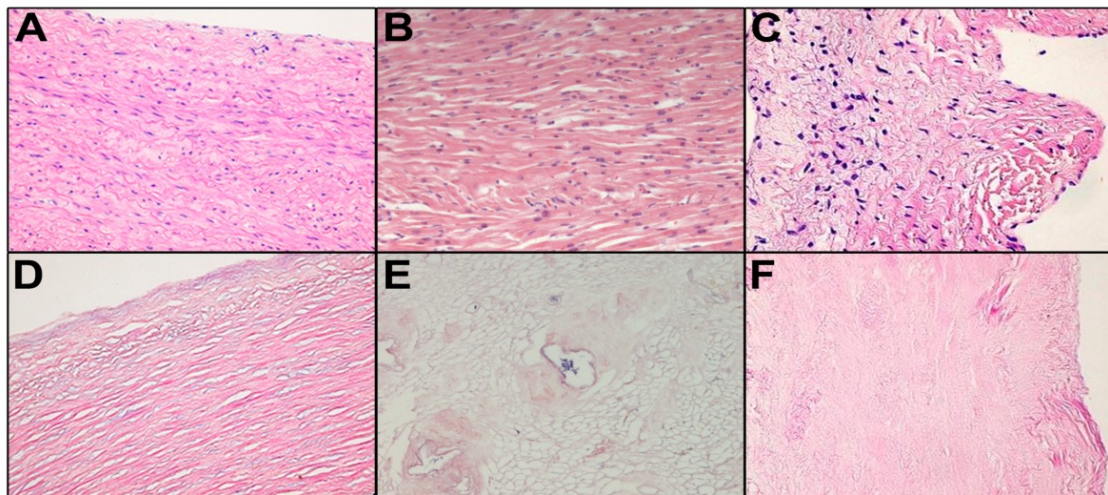


Figura 13. Análisis histológico demostrando la eliminación celular. Cortes teñidos con H&E (20x) de muestras no decelularizadas de aorta ascendente (Panel A), septo interventricular (Panel B), y válvula pulmonar (Panel C) comparadas con muestras decelularizadas de aorta ascendente (Panel D), septo interventricular (Panel E), y válvula pulmonar (Panel F).

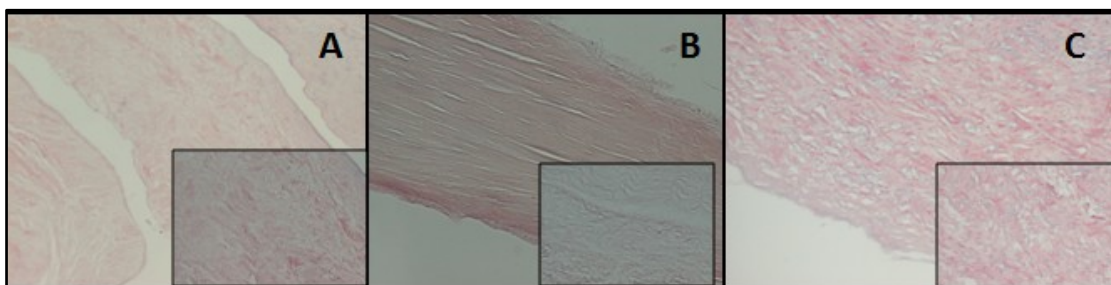


Figura 14. Análisis histológico demostrando la eliminación celular. Cortes teñidos con H&E de válvula tricúspide (Panel A), válvula mitral (Panel B) y válvula aórtica (Panel C). Se observa la ausencia total de material nuclear.

La cantidad de ADN residual en la matriz fue inferior al 5%, con una media en los 39 corazones decelularizados de 34 ± 29 ng vs 413 ± 262 ng en los corazones cadáver control ($p < 0.001$). Cuantificamos la cantidad de ADN residual en muestras representativas de distintas estructuras cardíacas observando en todas ellas < 50 ng de ADN de doble cadena por mg de tejido húmedo y una longitud de fragmentos de ADN < 200 bp. (Figura 15).

Por otro lado, el examen con tricrómico de Masson, tinción argéntica e inmunofijación reveló que la MECd había conservado los principales componentes estructurales de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina y laminina) de manera análoga a los corazones usados como control. (Figura 16, paneles A-C).

De igual modo, con microscopía electrónica de barrido y de transmisión se observó la ausencia de componentes celulares y la conservación de la orientación de las fibras miocárdicas en la matriz. (Figura 16, paneles D-E).

5.1.3. Integridad funcional de la matriz

Para evaluar la integridad funcional de la MECd, caracterizamos las propiedades pasivas mecánicas de la matriz mediante la medición de la rigidez en 8 corazones decelularizados en comparación con el corazón cadáver antes del proceso de decelularización.

Las curvas pasivas de presión – volumen (PV) pre y post decelularización mostraron la característica curva exponencial; (Figura 17, paneles A y B). Las matrices de ambos ventrículos fueron más compliantes que los ventrículos previa decelularización; [relación dP/dV pre and post decelularización para el ventrículo izquierdo: $0,87$ (95% IC: $0,55-1,13$) vs $0,12$ ($0-0,41$) mmHg/ml, $p < 0,001$; para el ventrículo derecho: $0,27$ (95% IC: $0,14-0,4$) vs $0,12$ ($0-0,25$), $p < 0,01$]. En los órganos intactos, el VI fue claramente más rígido que el VD ($0,87$ mmHg/ml vs $0,27$ mmHg/ml, $p < 0,001$). Sin embargo, las matrices de ambos ventrículos presentaron valores similares de rigidez ($p = 0,7$), excepto para volúmenes elevados donde el ventrículo izquierdo de la matriz resultó más rígido. (Figura 17, panel C). Así, la matriz extracelular contribuyó una media de una 38,5% a la rigidez global de la cámara ventricular derecha frente al 10% en la izquierda.

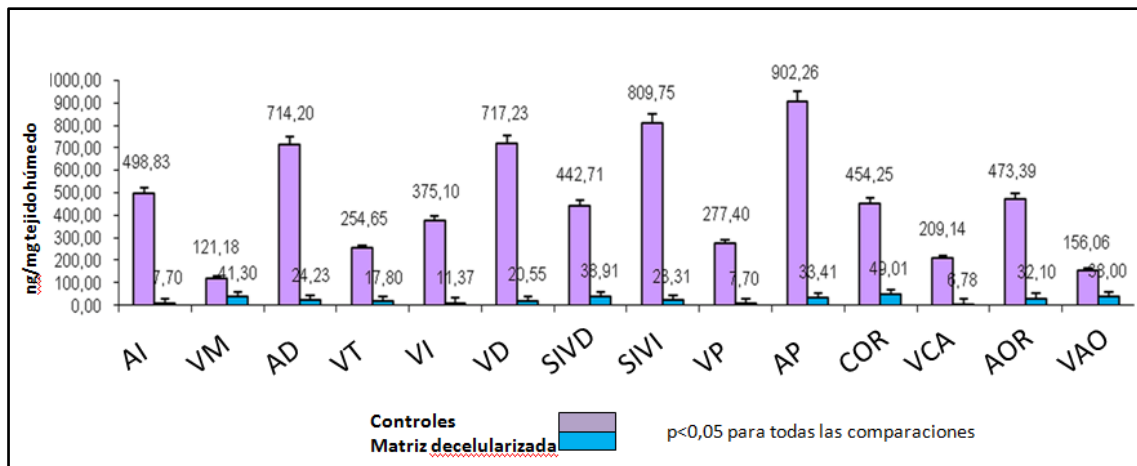


Figura 15. Cuantificación de ADN en las muestras control y las muestras decelularizadas. Aurícula izquierda (AI), válvula mitral (VM), aurícula derecha (AD), válvula tricúspide (VT), ventrículo izquierdo (VI), ventrículo derecho (VD), septo interventricular derecho (SIVD), septo interventricular izquierdo (SIVI), válvula pulmonar (VP), arterial pulmonar (AP), arteria coronaria (COR), vena cava (VCA), aorta ascendente (AA) y válvula aórtica (VAO).

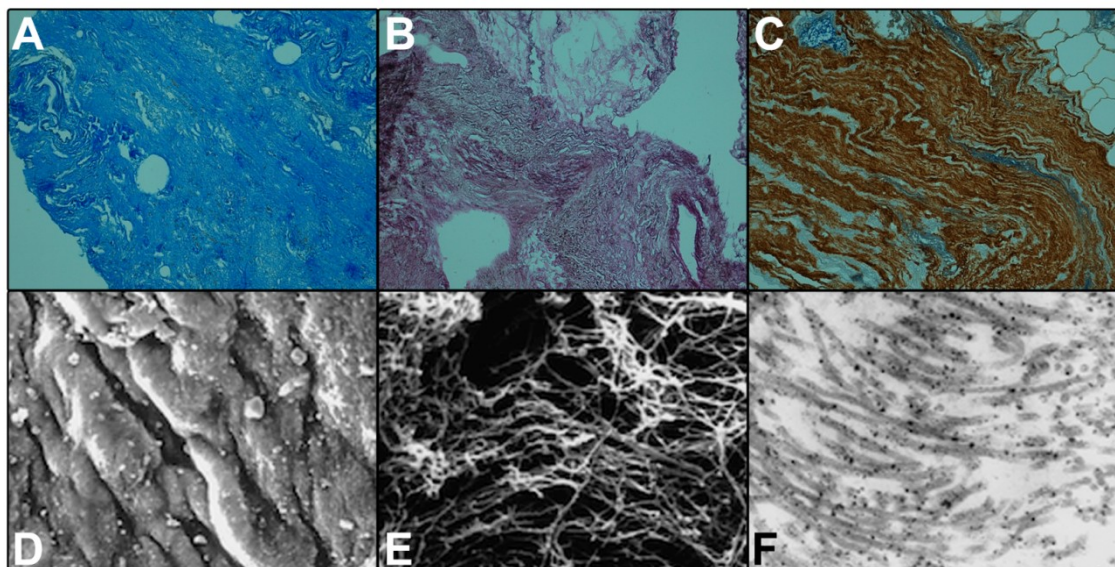


Figura 16. Retención de estructuras de la matriz extracelular. Tinción con tricrómico de Masson (Panel A), tinción argéntica (Panel B), e inmunofijación de colágeno IV (Panel C) de la MECd mostrando la retención de componentes de membrana estructurales (colágeno, fibronectina, y laminina). Microscopio electrónico de barrido del septo interventricular mostrando la presencia de miofibras (2,000x) en una muestra control no decelularizada (Panel D) y la preservación de fibras de colágeno y elastina (2,500x) con la eliminación de las células del tejido (Panel E) en una muestra decelularizada. Microscopio electrónico de transmisión (Panel F) de una muestra de septo interventricular decelularizado confirmando la ausencia de componentes celulares y la retención de fibras de colágeno y elastina (25.000x).

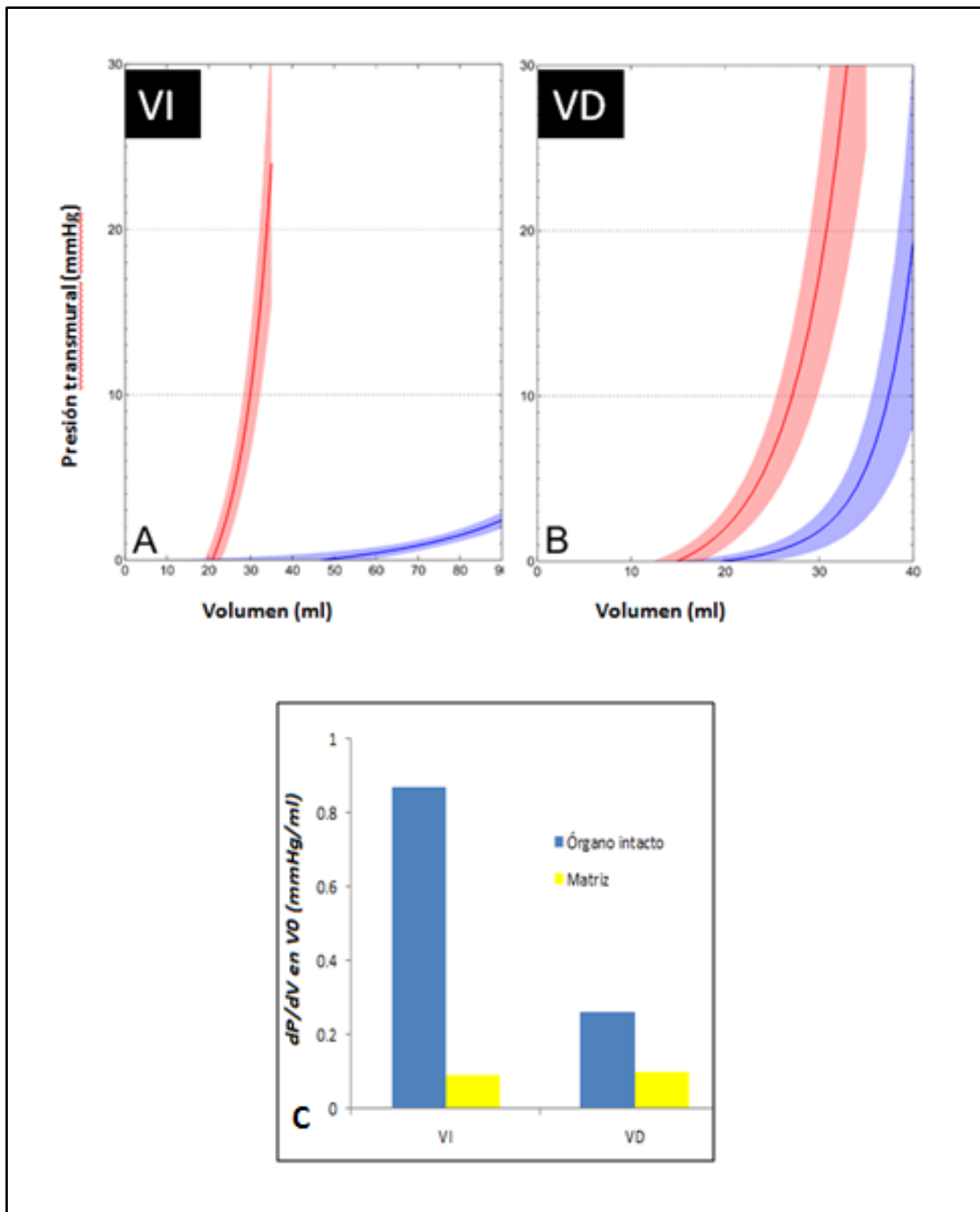


Figura 17. Análisis mecánico de la matriz. Curvas de PV de ventrículo izquierdo (panel A) y de ventrículo derecho (panel B) antes (en rojo) y después de la decelularización (en azul). La media está representada por la línea continua y la desviación standard por las franjas de color. El panel C muestra las diferencias en cuanto a rigidez de las cámaras de VI y VD pre y post decelularización. Las matrices fueron más compliantes que los corazones previa decelularización.

5.1.4. Integridad del sistema vascular

Mediante coronariografía convencional y ecocardiografía tras perfusión de contraste comprobamos que el proceso de decelularización había preservado la funcionalidad de los vasos epicárdicos y del lecho vascular miocárdico. Con OCT demostramos la conservación de las capas de la arteria descendente anterior. (Figura 18, paneles A-C). Perfundimos líquido hemático en el tronco coronario izquierdo observando a simple vista flujo epicárdico y por tanto, demostrando que la matriz es capaz de retener sangre en el espacio intravascular. (Figura 19).

El análisis histológico con H&E y tricrómico de Masson mostró tanto los conductos vasculares grandes como los vasos de menor calibre preservados, pero con ausencia total de los componentes celulares. (Figura 20, paneles A-C).

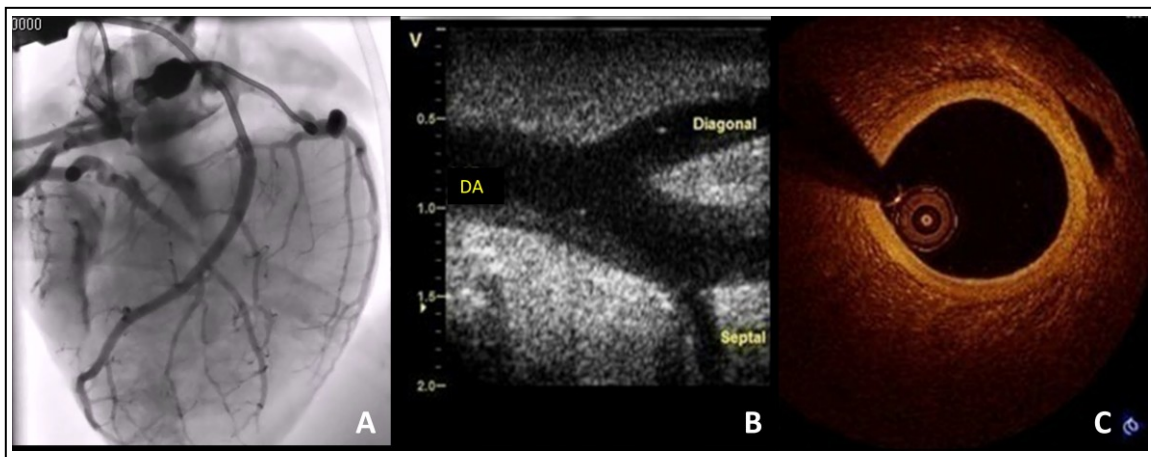


Figura 18. Angiografía coronaria (Panel A) de la matriz decelularizada mostrando el lecho vascular preservado, tanto vasos epicárdicos como ramos secundarios y terciarios. Ecocardiografía epicárdica. (Panel B) mostrando la integridad de la arteria descendente anterior (DA), su ramo diagonal y ramas septales. Tomografía de coherencia óptica (OCT) de la arteria descendente anterior (Panel C) mostrando las capas arteriales preservadas.

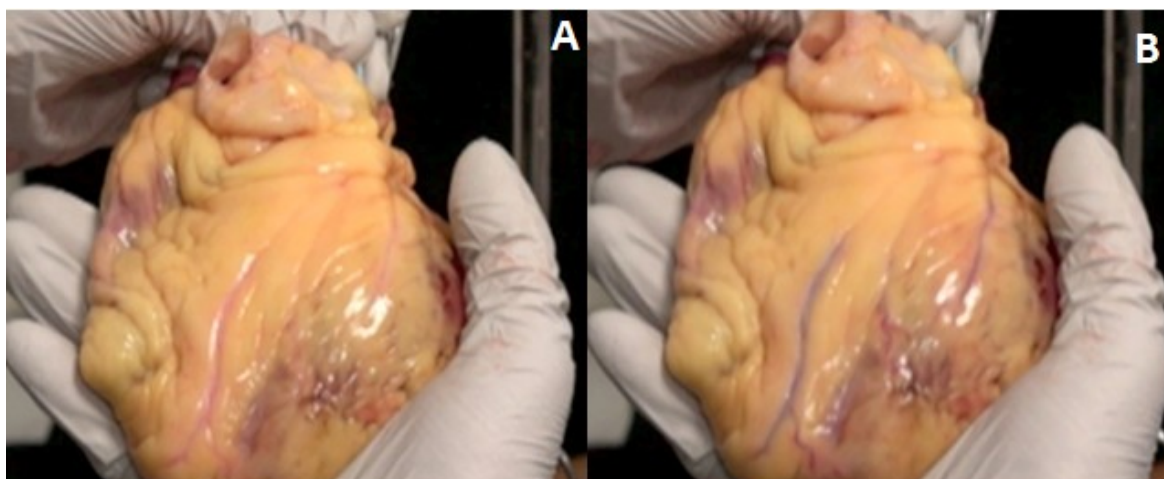


Figura 19. Estudios vasculares de la matriz cardíaca decelularizada. Perfusión de la arteria coronaria izquierda (Paneles A y B) con líquido hemático visualizando el flujo epicárdico y la perfusión sanguínea en la cara anterior del corazón.

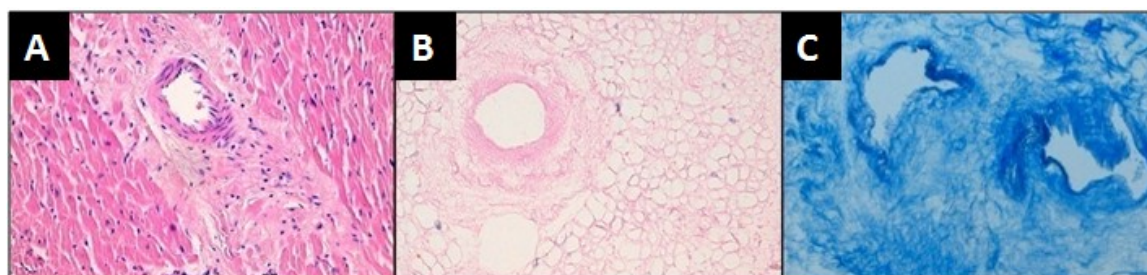
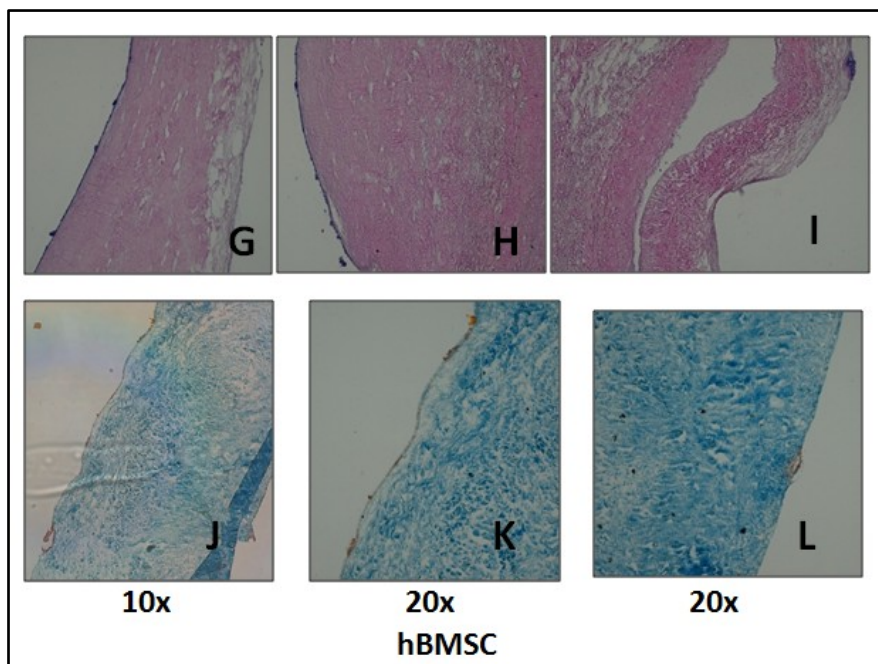
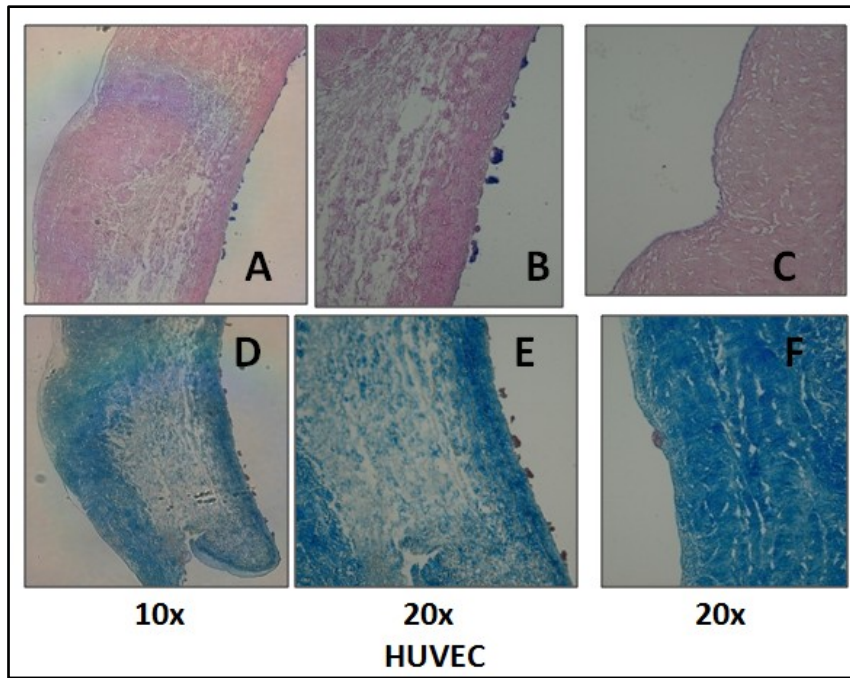


Figura 20. Estudios vasculares de la matriz cardíaca decelularizada. Cortes teñidos con H&E (20x) de una muestra correspondiente a arteria microvascular intramiocárdica de un corazón control (no decelularizado) (Panel A) comparado con una muestra decelularizada (Panel B). Conductos venosos y arteriales de pequeño tamaño decelularizados (Panel C) con tricrómico de Masson. (20x).

5.2. Resultados de citocompatibilidad

5.2.1. Distribución y alineamiento celular sobre válvula aórtica

El comportamiento observado de las células endoteliales HUVEC y las células hBMSC sobre válvula aórtica decelularizada fue muy similar. En ambos casos encontramos al sexto día de cultivo, una fina monocapa de células en la cara valvular depositadas sobre la lámina endotelial. También se encontraron algunas células en la lámina endotelial de la cara ventricular. No se observaron células en el interior de la matriz valvular decelularizada. (Figuras 21 y 22).



Figuras 21 y 22. Distribución y alineamiento de células HUVEC (paneles A-F) y células hBMSC (paneles G-L) en válvula decelularizada aórtica humana, a los 6 días del sembrado celular con H&E y con Tricrómico de Masson. En ambos casos se observa, en cortes tangenciales de la válvula, una monocapa de células alineadas predominantemente sobre la cara valvular (Paneles A-E y Paneles G-K). En la cara ventricular se observa mínima celularidad. (Paneles C-F y Paneles I-L).

4.2.4. Alineamiento y distribución celular en parches de miocardio

Utilizamos a las células mesenquimales (hBMSC) y a las células c kit + hCPC para evaluar la capacidad de la MECd para dirigir procesos de compromiso y diferenciación celular *in vitro*; las células endoteliales HUVEC y los cardiomiocitos H9c2 y HL1 se utilizaron para valorar el comportamiento de células maduras o diferenciadas en la matriz. (Figura 23, Paneles A-E)

A las 24 horas de sembrado, tanto las células hBMSC como las células hCPC, ambas marcadas con Dil y DAPI, se habían dispersado y depositado sobre la superficie de la matriz. A las 48 horas observamos que las células hBMSC habían aumentado de tamaño y comenzaban a infiltrar la MECd. A los 21 días habían infiltrado la matriz siendo evidente su aumento de tamaño aunque la alineación era incompleta. (Figura 23, paneles P y U).

Las células hCPC presentaron un comportamiento diferente, la infiltración de la matriz fue muy escasa y no había cambios en cuanto a su aspecto o alineación. (Figura 23, paneles Q y V).

Inicialmente las células HUVEC se encontraban en la superficie de la matriz pero, en lugar de adherirse, migraron para localizarse fundamentalmente en torno a los vasos sanguíneos más grandes en el interior de la matriz y en la superficie endocárdica de la misma. (Figura 23, paneles R y W). También encontramos algunas células HUVEC en vasos sanguíneos de menor tamaño.

Observamos que los cardiomiocitos H9c2 y HL1 se adherían a la matriz en la primeras 24 horas y comenzaban ya a alinearse. En los días siguientes se observaba una organización progresiva y aumento de tamaño. En el día 21, estaban organizadas en lo que parecían islotes musculares rodeados de matriz. Esta organización se asemejaba a ovillos musculares en cortes transversales y a fibras musculares en cortes longitudinales. (Figura 23, Paneles S, Y, T, Z). Las únicas células madre que mostraron una tendencia similar a organizarse de este modo fueron las células hBMSC, que comenzaron a organizarse en el día 21.

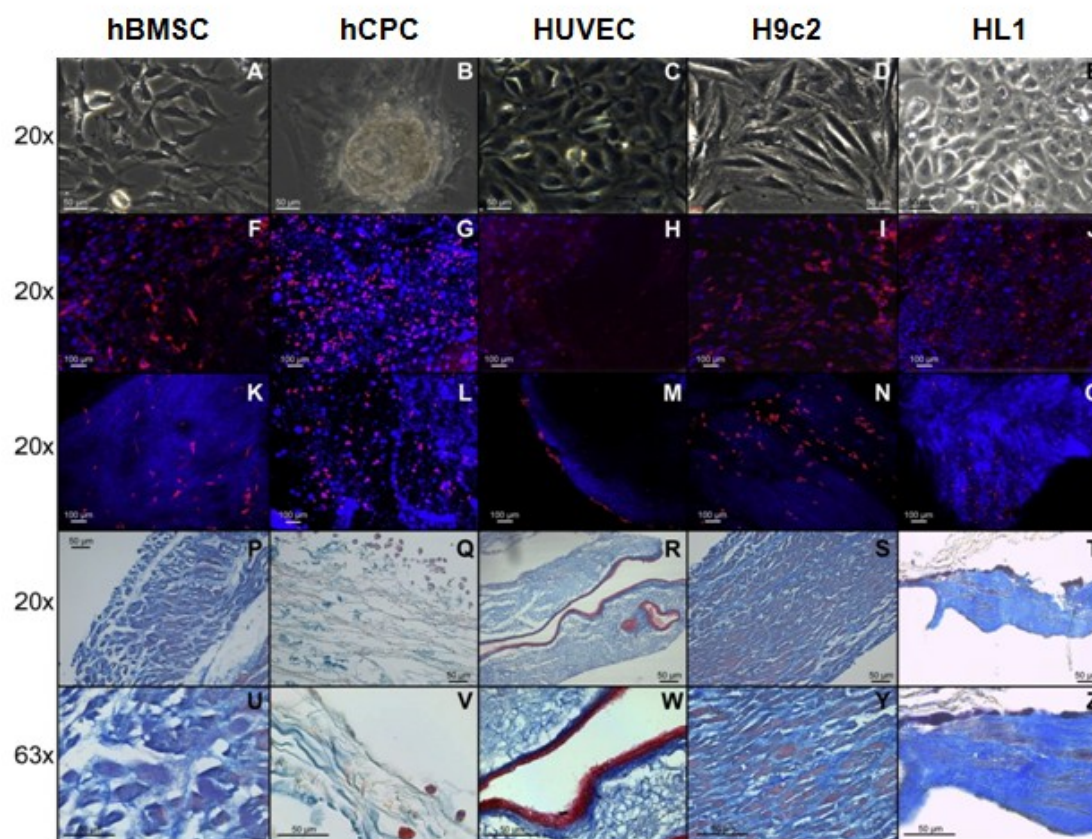


Figura 23. Citocompatibilidad de parches de ventrículo izquierdo decelularizado. Alineamiento y distribución celular. Imágenes de los siguientes cultivos celulares: células mesenquimales humanas derivadas de médula ósea (hBMSCs) (Panel A), células progenitoras cardíacas humanas hCPCs (Panel B), células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC) (Panel C), cardiomiocitos H9c2 (Panel D), y cardiomiocitos HL-1 (Panel E). Células teñidas con Dil (rojo) y DAPI (azul) sembradas en la superficie de parche de ventrículo izquierdo visualizadas con microscopio Confocal a los 5 días (Paneles F - J) y a los 21 días (Paneles K - O). Tinción con tricrómico de Masson a los 21 días mostrando las fibras de colágeno (azul) en un parche de ventrículo izquierdo decelularizado así como la distribución de las células: Las células hBMSCs infiltran la matriz, se observa crecimiento celular pero alineación incompleta, (Panel P y U); las células hCPC se ubican en la superficie del parche con muy escasa infiltración de la matriz y sin cambios importantes en el aspecto celular. (Panel Q y V); Las células endoteliales HUVEC se localizan en torno a vasos sanguíneos de gran tamaño. (Panel R y W); Las células H9c2 y HL1 se adhieren a la matriz y adoptan la alineación anatómica propia de los cardiomiocitos humanos. (Paneles S, Y y T, Z respectivamente).

5.2.3. Efecto de la matriz en la diferenciación de células ckit+ hCPC

Para valorar el potencial papel de la MECd a la hora de promover diferenciación de células progenitoras, cultivamos células c-Kit+ hCPC en parches de ventrículo izquierdo y ventrículo derecho y en un cultivo 2D de gelatina durante 21 días. Posteriormente realizamos qRT-PCR para determinados genes codificantes de factores de transcripción implicados en procesos de diferenciación y función del miocardio [MEF2C (factor potenciador de miocitos 2C), Nkx2.5 y GATA4] y para genes sarcoméricos [β MHC (gen sarcomérico de la cadena pesada de la beta miosina) y TNNT2 (Troponina cardiaca T)].

El crecimiento de células hCPC en parches de matriz de ventrículo derecho e izquierdo promovió mayor regulación de Nkx2.5, TNNT2 y β MHC en comparación con las células en el cultivo de gelatina. Además la expresión de genes cardíacos fue mayor en las células cultivadas en parches de ventrículo izquierdo que en los parches de ventrículo derecho. (Figura 24)

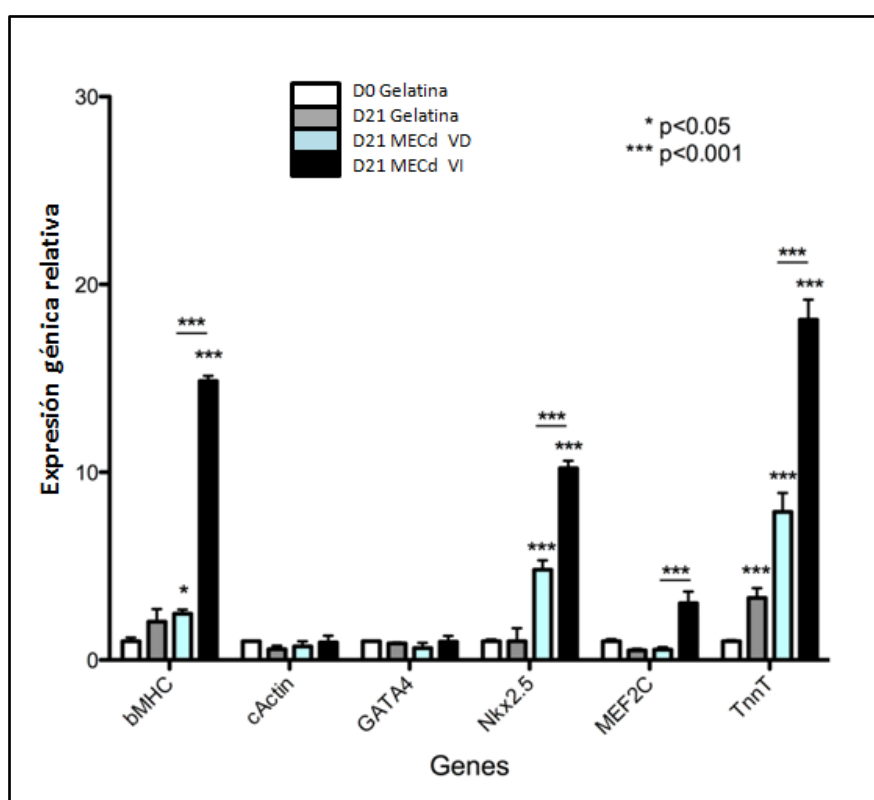


Figura 24. Expresión de genes marcadores de cardiomiocitos en células hCPCs (células cardíacas progenitoras humanas) a los 21 días de su crecimiento en ventrículo derecho e izquierdo humano decelularizado ó en placas de gelatina 1% (2D) al día 0 y al día 21.

5.2.4. Actividad celular eléctrica

Para valorar la actividad funcional electromecánica de las células madre y de los cardiomiocitos sembrados en la MECd cultivamos células hCPC, células hBMSC y cardiomiocitos H9c2 y HL-1 en parches de ventrículo izquierdo decelularizado y en gelatina durante 21 días. Pasado este tiempo, realizamos mapeo óptico para evaluar la presencia de corrientes de calcio y propagación de onda como se describe en 4.3.5.

Observamos que los cardiomiocitos (H9c2 y HL-1) que parecían haberse organizado en fibras similares a las musculares en la matriz, expresaban conexina 43 *in vitro*. (Figura 25). Las células eran capaces de propagar potenciales de acción y mostraron corrientes de calcio en respuesta a estimulación eléctrica. (Figura 26). Las células progenitoras hCPC y hBMSC, por el contrario, que no se habían organizado completamente en la matriz, no generaron corrientes de calcio ni propagaron señales eléctricas.

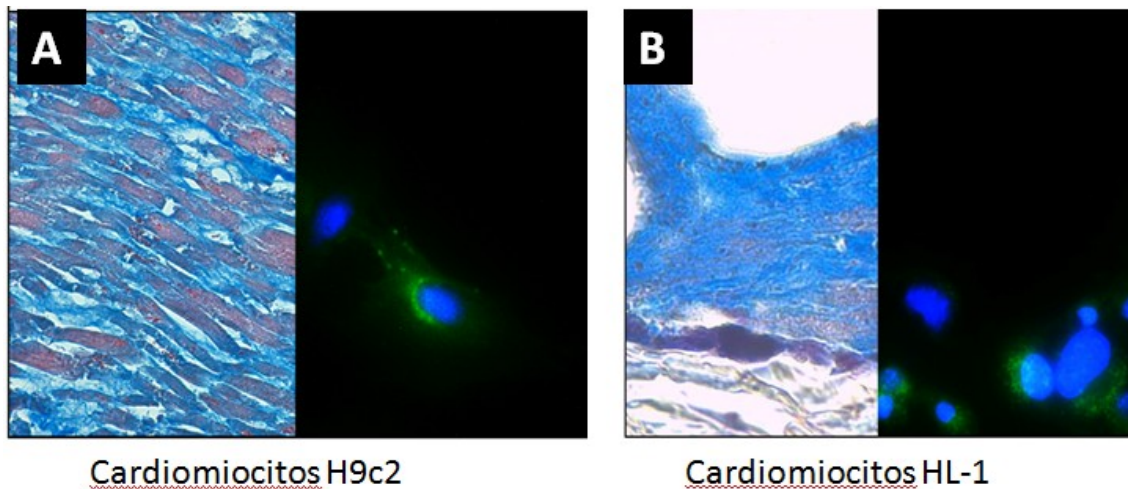


Figura 25. Células H9c2 (Panel A, x63) y HL1 (Panel B, x63) sembradas en parches de ventrículo izquierdo humano decelularizado que expresan conexina 43 (en verde) a los 21 días.

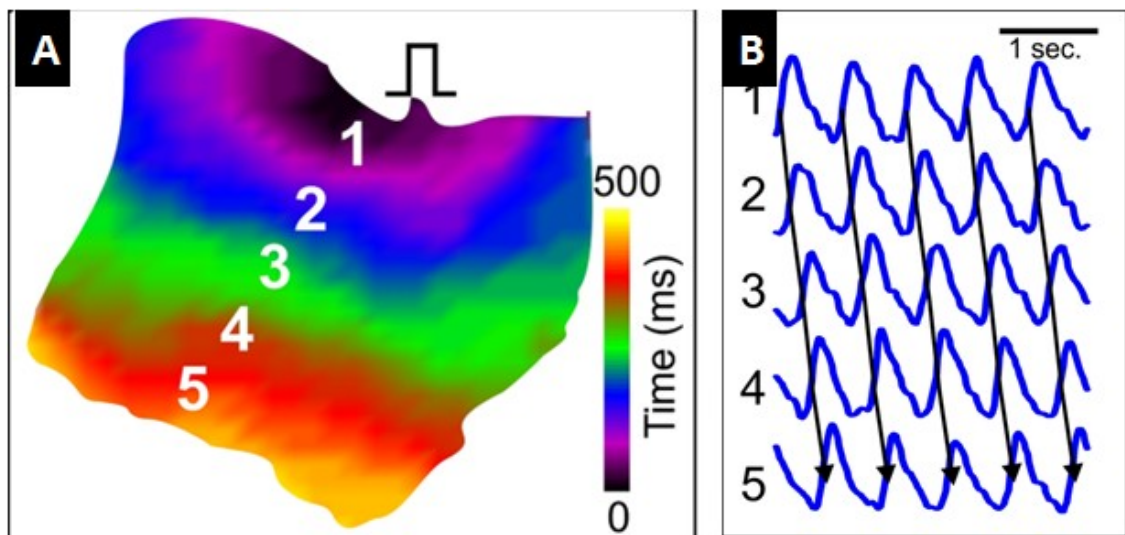


Figura 26. Mapa isocromal de la corriente de propagación de calcio (Panel A) y corriente de calcio de un píxel representativo (3) del panel A. (Panel B). Las células HL-1 propagan la actividad eléctrica desde el punto de estimulación a otras regiones de la matriz.

6.Discusión

Este trabajo demuestra de una manera concluyente que la técnica de decelularización utilizada en corazones murinos puede escalar con éxito a corazones humanos, siendo posible originar matrices tridimensionales extracelulares cardíacas humanas que cumplen los criterios de decelularización formulados por Crapo (103) y que son globalmente aceptados como válidos para considerar que se han eliminado las células de un órgano. Nuestro grupo fue el primer equipo de investigación del mundo que aplicó la decelularización por perfusión a un corazón completo humano en el año 2010, y desde entonces, como se demuestra en este trabajo, hemos podido reproducir los resultados y caracterizar estas matrices de una manera exhaustiva.

Un aspecto fundamental en la decelularización por perfusión es lograr un equilibrio entre una adecuada eliminación celular y una correcta preservación de la composición y estructura de la matriz extracelular decelularizada (MECd) (103, 129). La MECd es única a la hora de modular la respuesta celular en comparación con medios de cultivo convencionales debido a su configuración tridimensional, exclusiva para cada órgano e idealmente organizada para alojar a las células específicas del tejido; y a la presencia de moléculas en su interior con acción biológica (102).

Existen casi tantos protocolos de decelularización como grupos de investigación que han trabajado con ellos. Ninguno es capaz de preservar al 100% la composición nativa de las matrices y eliminar al mismo tiempo la totalidad del contingente celular. Probablemente lo ideal sea identificar un protocolo sencillo, lo menos agresivo posible para la matriz pero que al mismo tiempo consiga una eliminación celular suficiente como para garantizar que no va a producirse una respuesta inmune adversa en el huésped. Es probable que la presencia de mínimas cantidades de ADN residual en fragmentos de muy pequeño tamaño no sea un impedimento para recelularizar un órgano en lo que a inmunogenicidad se refiere (250). De hecho, una concentración de ADN residual inferior a 50 ng /mg de tejido se considera como criterio de decelularización por ser poco probable inducir una reacción inmune adversa en el receptor. Keane y colaboradores (126) caracterizaron la respuesta *in vitro* e *in vivo* (ratas Sprague Dawley) de macrófagos expuestos a 3 matrices de submucosa intestinal con grados variables de decelularización y observaron que los tejidos mejor decelularizados aún contenían una pequeña cantidad de ADN (62 ± 16.4 ng/mg de tejido) pero presentaban una respuesta inflamatoria favorable. Aunque es posible que se necesiten más trabajos para verificar estas conclusiones, ya que podrían existir otros factores añadidos que influyan en la relación matriz-huésped (126); la realidad es que la concentración de ácidos nucleicos es un

parámetro cuantitativo fácil de medir, reproducible y que permite comparar protocolos de decelularización distintos entre sí.

Para nuestro protocolo hemos decidido utilizar SDS 1% como agente decelularizante por varios motivos. El SDS ha demostrado decelularizar eficientemente corazones de modelos murinos (34, 38, 39, 41, 43) y corazones de cerdo (195). Con otros protocolos ensayados, sin embargo, se ha observado una pérdida muy significativa de elementos estructurales importantes de la matriz, como elastina, colágeno tipo IV y GAG (37). En corazones de cerdo, Merna y colaboradores (222) observaron que los protocolos que utilizaban tripsina daban lugar a matrices cardíacas muy débiles por la pérdida de fibras de colágeno. Nuestros resultados en 39 corazones cadáver muestran que el detergente iónico SDS 1% es muy eficaz para decelularizar un corazón humano adulto pudiendo realizar además un protocolo sencillo de aproximadamente 3-4 días de duración. Acortar los tiempos de decelularización sería muy deseable para minimizar las posibilidades de contaminación del órgano pero creemos que en corazones humanos de tamaño adulto es poco probable que esto pueda lograrse. Aunque habitualmente se compara por tamaño a los corazones adultos humanos y los modelos animales de cerdo, éstos últimos suelen corresponder a animales pequeños, de 4 a 6 meses de edad, lo que facilita el proceso habiéndose descrito en estos casos decelularización completa incluso en menos de 24 horas (226).

Hemos demostrado que tras el proceso de decelularización, la matriz conserva la anatomía macroscópica externa e interna del corazón, las válvulas son competentes, las fibras de la matriz extracelular mantienen su anisotropía y las células desaparecen no siendo visibles con técnicas histológicas convencionales. Además, hemos cuantificado de una manera muy rigurosa la concentración de ADN residual, recogiendo 16 muestras de distintas estructuras cardíacas de cada uno de los corazones decelularizados, incluyendo algunas que creemos especialmente difíciles de decelularizar como la válvula pulmonar (por estar más alejada de la aorta) ó el septo interventricular (debido a su grosor). En todas las estructuras sin excepción observamos una cantidad de ADN residual $< 50\text{ng/mg}$ de tejido húmedo.

Recientemente Wang y colaboradores (195) han descrito que la estimulación mecánica aplicada a matrices cardíacas puede modular el comportamiento de células progenitoras, facilitando su alineamiento. Hemos realizado un experimento que describe por primera vez la contribución de la MEC íntegra a las propiedades pasivas de las cámaras ventriculares humanas. El primer estudio que analizó la relación entre la estructura de la matriz extracelular y las propiedades mecánicas del miocardio mostró que el colágeno no afecta a la rigidez pasiva

ventricular (251). Resultados similares se han obtenido en trabajos que han analizado el efecto que tiene eliminar el pericardio visceral sobre la relación presión-volumen en corazones de cerdo (252). Ninguno de estos trabajos, sin embargo, tenía en cuenta a la matriz extracelular cardíaca completa y sus interacciones. Además, los datos de rigidez de matrices de ventrículo derecho son muy escasos (34, 220).

Hemos realizado un experimento que muestra cómo obtener medidas fisiológicas *ex vivo* en un corazón humano antes y después del proceso de decelularización. Las medidas de rigidez pasiva que hemos obtenido son similares a las medidas telediastólicas publicadas en otros trabajos que han realizado estudios *in vivo* en corazones latiendo en el contexto de incremento de precarga aguda (253). Al estar preservada la estructura tridimensional de la matriz, pensamos que nuestra metodología tiene en cuenta la contribución relativa de los compartimentos intra y extracelular sobre las propiedades globales de las cámaras. Nuestros resultados muestran que el comportamiento pasivo de la MEC sigue un patrón exponencial y que las matrices de ventrículo derecho (VD) e izquierdo (VI) tienen una rigidez similar, lo que sugiere que en el VD la contribución relativa de la MEC a la rigidez de la cámara es mayor que en el VI, siendo el componente celular el factor diferencial en el órgano intacto.

Probablemente sean necesarios más estudios comparando los valores pre y post decelularización para aclarar el papel de las células en las propiedades mecánicas de los ventrículos. A la vista de nuestros datos, creemos que el análisis de las curvas presión-volumen (PV) en matrices decelularizadas puede aportar mucha información para comprender mejor la mecánica del corazón.

La primera matriz bioartificial decelularizada y recelularizada con aplicación clínica fue una tráquea [Macchiarini y colaboradores (26)], que pudo ser trasplantada con éxito a un paciente oncológico que no tenía otra opción terapéutica. En el caso del corazón, las altas demandas metabólicas del miocardio (37) hacen necesario disponer de un sistema vascular para dar soporte a las células en la matriz si lo que se pretende es diseñar constructos cardíacos de tamaño suficiente como para tener aplicación clínica. Hemos comprobado que nuestra técnica de decelularización mantiene la funcionalidad de los vasos epicárdicos y del lecho microvascular miocárdico.

Los trabajos realizados con matrices humanas de corazón completo son hasta la fecha muy escasos. Nuestro trabajo es el más exhaustivo que se ha realizado hasta la fecha con respecto a la caracterización de una MECd. Guyette y colaboradores (224), en una serie de 10 corazones

humanos decelularizados también con SDS observaron, de forma similar a nosotros, la preservación ultraestructural de la matriz con microscopía óptica, inmunohistoquímica y microscopía electrónica pero sin embargo no aportaron datos acerca de la cuantificación de ADN residual.

En definitiva, creemos que con este trabajo hemos dado el primer paso para el diseño de una matriz completa cardíaca humana. Hemos aplicado la técnica de decelularización por perfusión por primera vez a un órgano humano complejo y hemos obtenido una matriz estructuralmente intacta, con válvulas competentes, que mantiene las propiedades mecánicas y la anisotropía de las fibras de la matriz extracelular así como un sistema vascular con vasos epicárdicos y microcirculación intacta.

Por otro lado, en este estudio hemos querido valorar el efecto que tiene la MECd cardíaca humana sobre células progenitoras y células diferenciadas, sin añadir ningún estímulo extra al cultivo con el objetivo de caracterizar el efecto que tiene la organización y composición intrínseca de la matriz humana decelularizada en la respuesta celular. Creemos que esta primera aproximación nos permite conocer el efecto real que ejerce la matriz sobre las células residentes. Los tejidos cardíacos humanos decelularizados utilizados en nuestro trabajo (válvula aórtica y parche de ventrículo izquierdo) han demostrado ser estructuras citocompatibles que permiten la viabilidad y el crecimiento *in vitro* de células progenitoras y de células diferenciadas.

Hemos observado que las matrices cardíacas humanas facilitan la organización de las células diferenciadas del parénquima cardíaco (cardiomiocitos H9c2 y HL1) y de las células vasculares en compartimentos tisulares específicos.

La endotelización de las matrices decelularizadas es un punto clave para la aplicación clínica de estos constructos ya que la recelularización del sistema vascular de la matriz es el aspecto más importante para evitar fenómenos de trombosis cuando las matrices se implantan *in vivo* (198). Kasimir y colaboradores (31) utilizaron células HUVEC sobre válvulas cardíacas porcinas previamente decelularizadas con Tritón X-100 y SDS y observaron la respuesta plaquetaria *in vitro* en comparación con válvulas decelularizadas. En este trabajo, las plaquetas se adherían a las válvulas acelulares mientras que las válvulas recelularizadas inhibían la adhesión y activación plaquetaria. Robertson y colaboradores (43) valoraron *in vivo* los efectos de la endotelización de la matriz. Para ello implantaron matrices recelularizadas con células endoteliales en ratas y lo compararon con el implante de constructos decelularizados. Los

corazones recelularizados mostraron menos trombogenicidad que las matrices acelulares control. En nuestro trabajo hemos observado que las células HUVEC migran a lo largo de la matriz para ordenarse alrededor de los vasos sanguíneos y no se observan células endoteliales dispersas en ninguna otra localización de la matriz ventricular. Sobre la válvula aórtica el comportamiento de las células HUVEC fue parecido, observando ya a las 48 horas una monocapa de células sobre la lámina endotelial aórtica y algunas alineadas en la lámina endotelial del lado ventricular de la válvula. Nuevamente y de manera característica, tampoco observamos células endoteliales en el interior del parénquima de la válvula aórtica.

Los cardiomiocitos H9c2 y HL1 sembrados en parches de ventrículo mostraron una clara tendencia a agruparse en estructuras similares a fibras cardíacas musculares. Estudios realizados sobre matrices cardíacas de modelos animales han observado que los cardiomiocitos tienen la capacidad de contraerse en respuesta a estímulos eléctricos (34, 36, 44). Hemos mostrado por primera vez que los cardiomiocitos, en el seno de matrices decelularizadas humanas, forman conexiones intercelulares funcionales ya que tanto las células H9c2 como las HL-1 expresaron conexina 43 y eran capaces de propagar potenciales de acción en respuesta a estimulación eléctrica. Aunque la velocidad de conducción en la matriz era inferior a la observada en el miocardio humano, es posible que la estimulación electromecánica de los parches cardíacos recelularizados durante el cultivo favorezca todavía más el acoplamiento eléctrico intercelular aumentando la velocidad de conducción; como observó el grupo de Taylor (34) en el primer trabajo publicado de decelularización-recelularización de un corazón murino.

Hemos observado que la matriz cardíaca humana permite la supervivencia de las células progenitoras implantadas (hCPCs y hBMSCs), un hallazgo común con otros estudios de células madre en matrices cardíacas de modelos animales (36, 38, 41, 195). Las células progenitoras cardíacas residentes apenas infiltraron la matriz y tampoco cambiaron su morfología. Las células hBMSC por el contrario sí infiltraron la matriz, aumentaron de tamaño y alrededor del día 21 comenzaron a alinearse, aunque de manera incompleta. Que los distintos tipos de células progenitoras no se comportan de igual modo sobre matrices decelularizadas es un hecho observado en otros trabajos anteriores (200). Es posible que estas diferencias se deban en parte a las distintas preferencias de adhesión que algunos autores han atribuido a las células madre según el tipo celular. En este sentido, se ha propuesto como estrategia para optimizar el cultivo y promover diferenciación celular la funcionalización de la matriz con proteínas y/o factores de crecimiento específicos (49, 50, 53, 204-206). Los trabajos realizados

hasta la fecha no han podido demostrar que las células indiferenciadas puedan originar tejido miocárdico totalmente funcional sin más ayuda que la que le proporciona el microambiente de la matriz decelularizada. No obstante, este microambiente es un co-factor muy importante que, si bien no completamente, sí es capaz de inducir diferenciación celular. En matrices cardíacas humanas decelularizadas hemos observado este fenómeno a los 21 días de cultivo de células hCPC en matrices de ventrículo izquierdo y derecho. Comparados con cultivos estáticos convencionales, las células hCPC en parches de ventrículo mostraron un incremento significativo en la expresión de β MHC, MEF2C, Nkx2.5 y TnnT. Curiosamente, la expresión génica fue mayor en hCPCs cultivadas en ventrículo izquierdo que en ventrículo derecho. Algunos de los factores que pueden contribuir a esta observación son una composición diferente de las matrices de VI y VD, distinta distribución de factores de crecimiento ó arquitectura ventricular de las matrices diferente (254).

La elección del tipo celular para repoblar la matriz es muy importante. Las mejores candidatas son células que puedan ser fácilmente aisladas de una manera reproducible y que además puedan expandirse *in vitro* hasta obtener un número suficiente de células para ser sembradas en la matriz; deberíamos poder inducir las a diferenciarse en las líneas específicas del tejido y deberían tener capacidad de sobrevivir hasta ser funcionalmente maduras. Idealmente sería muy deseable disponer de células autólogas que tienen la gran ventaja de que es muy improbable que sufran rechazo u otro tipo de reacciones inmunológicas adversas por parte del receptor haciendo innecesario el uso de inmunosupresores. El riesgo potencial de transmisión de infecciones y el riesgo tumoral también es menor con las células autólogas. Sin embargo, las células alogénicas pueden reclutarse de sujetos sanos y más jóvenes y su gran ventaja frente a las células autólogas es que pueden expandirse en grandes cantidades generando así un “producto celular” que puede almacenarse y estar disponible con antelación para su uso.

Existe un intenso debate en el momento actual con respecto a si las células mesenquimales realmente tienen la capacidad de diferenciación *in vivo* que se les ha atribuido (255). Los trabajos que lo afirman (188) no han podido ser reproducidos por otros investigadores y en general se acepta que estos procesos de diferenciación son muy raros e impredecibles. En nuestro trabajo las células hBMSC han demostrado ser capaces de infiltrar la matriz y aumentar de tamaño pero no hemos observado ordenamiento estructurado como con los cardiomiocitos H9c2 y HL-1. Sin embargo, otros trabajos sí han demostrado que las células MSC tienen capacidad de diferenciación fenotípica a cardiomiocitos en el seno de matrices

cardíacas decelularizadas, sobre todo en presencia de azacitidina y estimulación simultánea eléctrica y mecánica (195). Otro grupo celular muy interesante, aunque no ha sido objeto de estudio en este trabajo, son los cardiomiocitos derivados de células iPS. El estudio de Lu (41) sobre matrices cardíacas de ratón mostró resultados sorprendentes con cardiomiocitos derivados de iPS. Tras ser perfundidas por vía aórtica, las células repoblaron la matriz y en 20 días formaron filamentos, demostraron contracción espontánea y ser sensibles a fármacos como isoprenalina ó E4031, un inductor de arritmias ventriculares.

Nuestro trabajo supone el análisis más extenso hasta la fecha sobre células progenitoras o cardiomiocitos sembrados en MECd cardíacas de origen humano. Basándonos en nuestros hallazgos, creemos que las matrices biológicas decelularizadas de órganos complejos tienen una organización que es específica del tejido al que sustentan y unas moléculas también específicas del tejido que promueven compromiso y diferenciación celular en su interior. Esto les confiere una gran ventaja frente a matrices sintéticas como soporte para el diseño de tejidos biológicos.

Para finalizar cabe preguntarse si realmente el corazón humano decelularizado es la mejor opción para obtener matrices sobre las que diseñar tejido cardíaco funcional. A priori resultaría ideal disponer de matrices humanas recelularizadas con tipos celulares autólogos para evitar problemas de inmunogenicidad. El concepto de reciprocidad dinámica entre la MEC y las células residentes sugiere que las matrices humanas pueden tener importantes ventajas sobre órganos xenogénicos. Pero a pesar de todo lo anterior, no podemos perder de vista que los trabajos de decelularización de matrices humanas cardíacas se realizan con órganos rechazados para trasplante, por tanto, órganos no sanos. Aunque hemos demostrado de manera incuestionable que decelularizar un corazón humano es posible, y que es además una estructura citocompatible; la falta lógica de disponibilidad de órganos sanos para construir matrices hacen poco probable que al menos por el momento las matrices cardíacas humanas puedan ser usadas de manera rutinaria como plataforma para diseñar miocardio funcional con aplicabilidad clínica. Sí creemos, no obstante, que nuestro modelo de MECd humana cardíaca es una excelente prueba de concepto y que puede utilizarse como una herramienta para estudiar las interacciones de las células con la matriz, profundizar en el estudio de la biomecánica cardíaca y entender los mecanismos que regulan la diferenciación celular y guían la regeneración tisular cardíaca.

Creemos firmemente que nuestro trabajo aporta nuevas evidencias para pensar que el diseño de tejido miocárdico funcional a partir de matrices decelularizadas puede ser una

alternativa terapéutica fascinante y no tan lejana en el tiempo para el manejo de las enfermedades cardiovasculares.

7.Conclusiones

Las conclusiones finales de este trabajo son las siguientes:

1. Eliminar las células de un corazón adulto humano mediante la perfusión de detergentes iónicos (SDS) dando lugar a una matriz tridimensional acelular es factible en un proceso que dura aproximadamente 4 días.
2. La matriz tridimensional resultante mantiene la estructura macroscópica, la ultraestructura y una composición muy similar a la matriz extracelular nativa cardíaca.
3. Los vasos epicárdicos y la microcirculación coronaria se mantienen impermeables después del proceso de decelularización pudiendo utilizarse para perfundir el corazón decelularizado.
4. Es posible determinar *ex vivo* las propiedades físicas de la matriz extracelular manteniendo la estructura de la cámara ventricular. Las curvas de presión –volumen en las matrices siguen una relación exponencial teniendo una rigidez similar las matrices de ventrículo derecho e izquierdo.
5. La matriz extracelular cardíaca humana es una estructura que permite la adhesión y viabilidad de las células endoteliales y cardiomiocitos diferenciados y también de las células progenitoras utilizadas en este estudio.
6. La ordenación de cardiomiocitos a modo de fibras musculares en el seno de la matriz, la expresión de conexina 43 y la observación de acoplamiento eléctrico intercelular así como el alineamiento de las células endoteliales alrededor de los vasos; confirma la capacidad que tienen la matriz tridimensional cardíaca humana para dirigir y modular el comportamiento de las células diferenciadas en su interior.
7. El aumento de la expresión génica de factores de transcripción cardíacos y proteínas sarcoméricas por parte de las células progenitoras residentes cardíacas c kit + cuando son sembradas en la matriz frente a las mismas célula sembradas sobre gelatina, confirma la capacidad de la matriz para inducir diferenciación en células progenitoras.

8. Es posible que el corazón humano decelularizado sea la mejor matriz tridimensional para continuar con estudios de tejidos bioartificiales cardíacos. Sin embargo, la falta de disponibilidad de corazones, y el uso de corazones no válidos para trasplante, nos hacen concluir que, para su aplicación clínica, estos conocimientos posiblemente deban trasladarse a matrices tridimensionales de origen xenogénico.

8.Bibliografía

1. McMurray JJ, Petrie MC, Murdoch DR, Davie AP. Clinical epidemiology of heart failure: public and private health burden. *Eur Heart J*. 1998;19 Suppl P:P9-16.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292.
3. Sayago-Silva I, García-López F, Segovia-Cubero J. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca en España en los últimos 20 años. *Revista Española de Cardiología*. 2013;66(8):649-56.
4. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(1):30-41.
5. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2006;355(3):251-9.
6. Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, Austin PC, Fang J, Haouzi A, et al. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med*. 2006;355(3):260-9.
7. Grigorian Shamagian L, Gonzalez-Juanatey JR, Roman AV, Acuna JM, Lamela AV. The death rate among hospitalized heart failure patients with normal and depressed left ventricular ejection fraction in the year following discharge: evolution over a 10-year period. *Eur Heart J*. 2005;26(21):2251-8.
8. Pons F, Lupon J, Urrutia A, Gonzalez B, Crespo E, Diez C, et al. Mortalidad y causas de muerte en pacientes con insuficiencia cardíaca: experiencia de una unidad especializada multidisciplinaria. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63(3):303-14.
9. Organización Nacional de Trasplantes. Memoria de actividad de trasplante cardíaco 2013. Disponible en: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20trasplante%20cardiaco%202013.pdf>.
10. González-Vílchez F, Gómez-Bueno M, Almenar L, Crespo-Leiro MG, Arizón JM, Palomo J, et al. Registro Español de Trasplante Cardíaco. XXV Informe Oficial de la Sección de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante Cardíaco de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2013). *Revista Española de Cardiología*. 2014;67(12):1039-51.
11. Eschenhagen T, Zimmermann WH. Engineering myocardial tissue. *Circ Res*. 2005;97(12):1220-31.
12. Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, Zhong DS, Chen C. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Med Eng Phys*. 2002;24(3):173-83.
13. Dahl SL, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*. 2003;12(6):659-66.
14. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21(22):2215-31.
15. Uchimura E, Sawa Y, Taketani S, Yamanaka Y, Hara M, Matsuda H, et al. Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol). *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(3):834-7.
16. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med*. 2001;344(7):532-3.
17. L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N Engl J Med*. 2007;357(14):1451-3.
18. Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*. 2004;25(13):2679-86.
19. Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res*. 1989;47(1):74-80.
20. Badylak SF, Tullius R, Kokini K, Shelbourne KD, Klootwyk T, Voytik SL, et al. The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model. *J Biomed Mater Res*. 1995;29(8):977-85.

21. Kropp BP, Eppley BL, Prevel CD, Rippey MK, Harruff RC, Badylak SF, et al. Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute. *Urology*. 1995;46(3):396-400.
22. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. *Urology*. 1999;54(3):407-10.
23. Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ, Geddes LA, Rundell AE. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2004;25(12):2353-61.
24. Gilbert TW, Stolz DB, Biancaniello F, Simmons-Byrd A, Badylak SF. Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2005;26(12):1431-5.
25. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006;367(9518):1241-6.
26. Macchiarini P, Wallis T, Biancosino C, Mertsching H. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;128(4):638-41.
27. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008;372(9655):2023-30.
28. Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, et al. Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1998;14(3):279-84.
29. Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis*. 2002;11(4):457-62.
30. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27(4):566-71.
31. Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs*. 2003;26(5):421-7.
32. Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. *J Heart Valve Dis*. 2002;11(4):463-71.
33. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhuber KJ, et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol*. 2003;143(3):201-8.
34. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TJ, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008;14(2):213-21.
35. Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, Freytes DO, Tobita K, Gilbert TW, et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(3):525-32.
36. Eitan Y, Sarig U, Dahan N, Machluf M. Acellular cardiac extracellular matrix as a scaffold for tissue engineering: in vitro cell support, remodeling, and biocompatibility. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(4):671-83.
37. Akhyari P, Aubin H, Gwanmesia P, Barth M, Hoffmann S, Huelsmann J, et al. The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17(9):915-26.
38. Ng SL, Narayanan K, Gao S, Wan AC. Lineage restricted progenitors for the repopulation of decellularized heart. *Biomaterials*. 2011;32(30):7571-80.
39. Crawford Bea. Cardiac decellularisation with long-term storage and repopulation with canine peripheral blood progenitor cells. *Can J Chem Eng*. 2012;90:1457.

40. Hulsmann J, Aubin H, Kranz A, Godehardt E, Munakata H, Kamiya H, et al. A novel customizable modular bioreactor system for whole-heart cultivation under controlled 3D biomechanical stimulation. *J Artif Organs*. 2013;16(3):294-304.
41. Lu TY, Lin B, Kim J, Sullivan M, Tobita K, Salama G, et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nat Commun*. 2013;4:2307.
42. Oberwallner B, Brodarac A, Choi Y-H, Saric T, Anić P, Morawietz L, et al. Preparation of cardiac extracellular matrix scaffolds by decellularization of human myocardium. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(9):3263-72.
43. Robertson MJ, Dries-Devlin JL, Kren SM, Burchfield JS, Taylor DA. Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix. *PLoS One*. 2014;9(2):e90406.
44. Weymann A, Patil NP, Sabashnikov A, Jungebluth P, Korkmaz S, Li S, et al. Bioartificial heart: a human-sized porcine model--the way ahead. *PLoS One*. 2014;9(11):e111591.
45. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomidou L, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med*. 2010;16(8):927-33.
46. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*. 2010;329(5991):538-41.
47. Price AP, England KA, Matson AM, Blazar BR, Panoskaltsis-Mortari A. Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(8):2581-91.
48. Cortiella J, Niles J, Cantu A, Brettler A, Pham A, Vargas G, et al. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(8):2565-80.
49. Daly AB, Wallis JM, Borg ZD, Bonvillain RW, Deng B, Ballif BA, et al. Initial binding and recellularization of decellularized mouse lung scaffolds with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(1-2):1-16.
50. Bonvillain RW, Danchuk S, Sullivan DE, Betancourt AM, Semon JA, Eagle ME, et al. A nonhuman primate model of lung regeneration: detergent-mediated decellularization and initial in vitro recellularization with mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(23-24):2437-52.
51. Nichols JE, Niles J, Riddle M, Vargas G, Schilagard T, Ma L, et al. Production and assessment of decellularized pig and human lung scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(17-18):2045-62.
52. O'Neill JD, Anfang R, Anandappa A, Costa J, Javidfar J, Wobma HM, et al. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *Ann Thorac Surg*. 2013;96(3):1046-55; discussion 55-6.
53. Lecht S, Stabler CT, Rylander AL, Chiaverelli R, Schulman ES, Marcinkiewicz C, et al. Enhanced reseeded of decellularized rodent lungs with mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*. 2014;35(10):3252-62.
54. Song JJ, Kim SS, Liu Z, Madsen JC, Mathisen DJ, Vacanti JP, et al. Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats. *Ann Thorac Surg*. 2011;92(3):998-1005; discussion -6.
55. Wallis JM, Borg ZD, Daly AB, Deng B, Ballif BA, Allen GB, et al. Comparative assessment of detergent-based protocols for mouse lung de-cellularization and re-cellularization. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(6):420-32.
56. Jensen T, Roszell B, Zang F, Girard E, Matson A, Thrall R, et al. A rapid lung de-cellularization protocol supports embryonic stem cell differentiation in vitro and following implantation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(8):632-46.

57. Booth AJ, Hadley R, Cornett AM, Dreffe AA, Matthes SA, Tsui JL, et al. Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(9):866-76.
58. Bonenfant NR, Sokocevic D, Wagner DE, Borg ZD, Lathrop MJ, Lam YW, et al. The effects of storage and sterilization on de-cellularized and re-cellularized whole lung. *Biomaterials*. 2013;34(13):3231-45.
59. Sokocevic D, Bonenfant NR, Wagner DE, Borg ZD, Lathrop MJ, Lam YW, et al. The effect of age and emphysematous and fibrotic injury on the re-cellularization of de-cellularized lungs. *Biomaterials*. 2013;34(13):3256-69.
60. Ghaedi M, Calle EA, Mendez JJ, Gard AL, Balestrini J, Booth A, et al. Human iPS cell-derived alveolar epithelium repopulates lung extracellular matrix. *J Clin Invest*. 2013;123(11):4950-62.
61. Bonvillain RW, Scarritt ME, Pashos NC, Mayeux JP, Meshberger CL, Betancourt AM, et al. Nonhuman primate lung decellularization and recellularization using a specialized large-organ bioreactor. *J Vis Exp*. 2013(82):e50825.
62. Mendez JJ, Ghaedi M, Steinbacher D, Niklason LE. Epithelial cell differentiation of human mesenchymal stromal cells in decellularized lung scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(11-12):1735-46.
63. Wagner DE, Bonenfant NR, Parsons CS, Sokocevic D, Brooks EM, Borg ZD, et al. Comparative decellularization and recellularization of normal versus emphysematous human lungs. *Biomaterials*. 2014;35(10):3281-97.
64. Scarritt ME, Bonvillain RW, Burkett BJ, Wang G, Glotser EY, Zhang Q, et al. Hypertensive rat lungs retain hallmarks of vascular disease upon decellularization but support the growth of mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(9-10):1426-43.
65. Gilpin SE, Guyette JP, Gonzalez G, Ren X, Asara JM, Mathisen DJ, et al. Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33(3):298-308.
66. Kajbafzadeh AM, Sabetkish N, Sabetkish S, Tavangar SM, Hossein Beigi RS, Talebi MA, et al. Lung tissue engineering and preservation of alveolar microstructure using a novel casting method. *Biotech Histochem*. 2015;90(2):111-23.
67. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*. 2010;16(7):814-20.
68. Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, Rodriguez SR, Atala A, Soker S. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology*. 2011;53(2):604-17.
69. Soto-Gutierrez A, Zhang L, Medberry C, Fukumitsu K, Faulk D, Jiang H, et al. A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17(6):677-86.
70. Barakat O, Abbasi S, Rodriguez G, Rios J, Wood RP, Ozaki C, et al. Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ. *J Surg Res*. 2012;173(1):e11-25.
71. Shirakigawa N, Ijima H, Takei T. Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering. *J Biosci Bioeng*. 2012;114(5):546-51.
72. Shirakigawa N, Takei T, Ijima H. Base structure consisting of an endothelialized vascular-tree network and hepatocytes for whole liver engineering. *J Biosci Bioeng*. 2013;116(6):740-5.
73. Yagi H, Fukumitsu K, Fukuda K, Kitago M, Shinoda M, Obara H, et al. Human-scale whole-organ bioengineering for liver transplantation: a regenerative medicine approach. *Cell Transplant*. 2013;22(2):231-42.
74. Shupe T, Williams M, Brown A, Willenberg B, Petersen BE. Method for the decellularization of intact rat liver. *Organogenesis*. 2010;6(2):134-6.

75. Zhou P, Lessa N, Estrada DC, Severson EB, Lingala S, Zern MA, et al. Decellularized liver matrix as a carrier for the transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice. *Liver Transpl.* 2011;17(4):418-27.
76. Bao J, Shi Y, Sun H, Yin X, Yang R, Li L, et al. Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and hepatocytes in rats. *Cell Transplant.* 2011;20(5):753-66.
77. Wang X, Cui J, Zhang BQ, Zhang H, Bi Y, Kang Q, et al. Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and differentiation of mouse fetal hepatic progenitors. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(4):1017-25.
78. Mirmalek-Sani SH, Sullivan DC, Zimmerman C, Shupe TD, Petersen BE. Immunogenicity of decellularized porcine liver for bioengineered hepatic tissue. *Am J Pathol.* 2013;183(2):558-65.
79. Ji R, Zhang N, You N, Li Q, Liu W, Jiang N, et al. The differentiation of MSCs into functional hepatocyte-like cells in a liver biomatrix scaffold and their transplantation into liver-fibrotic mice. *Biomaterials.* 2012;33(35):8995-9008.
80. Sabetkish S, Kajbafzadeh AM, Sabetkish N, Khorramirouz R, Akbarzadeh A, Seyedian SL, et al. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix liver scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(4):1498-508.
81. Jiang WC, Cheng YH, Yen MH, Chang Y, Yang VW, Lee OK. Cryo-chemical decellularization of the whole liver for mesenchymal stem cells-based functional hepatic tissue engineering. *Biomaterials.* 2014;35(11):3607-17.
82. Kadota Y, Yagi H, Inomata K, Matsubara K, Hibi T, Abe Y, et al. Mesenchymal stem cells support hepatocyte function in engineered liver grafts. *Organogenesis.* 2014;10(2):268-77.
83. Mirmalek-Sani SH, Orlando G, McQuilling JP, Pareta R, Mack DL, Salvatori M, et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials.* 2013;34(22):5488-95.
84. Goh SK, Bertera S, Olsen P, Candiello JE, Halfter W, Uechi G, et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials.* 2013;34(28):6760-72.
85. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, Terada N, Clapp WL, Adin C, et al. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(11):2338-47.
86. Ross EA, Abrahamson DR, St John P, Clapp WL, Williams MJ, Terada N, et al. Mouse stem cells seeded into decellularized rat kidney scaffolds endothelialize and remodel basement membranes. *Organogenesis.* 2012;8(2):49-55.
87. Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(7):2207-16.
88. Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF. Renal tissue engineering with decellularized rhesus monkey kidneys: age-related differences. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(23-24):2891-901.
89. Orlando G, Farney AC, Iskandar SS, Mirmalek-Sani SH, Sullivan DC, Moran E, et al. Production and implantation of renal extracellular matrix scaffolds from porcine kidneys as a platform for renal bioengineering investigations. *Ann Surg.* 2012;256(2):363-70.
90. Sullivan DC, Mirmalek-Sani SH, Deegan DB, Baptista PM, Aboushwareb T, Atala A, et al. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials.* 2012;33(31):7756-64.
91. Song JJ, Guyette JP, Gilpin SE, Gonzalez G, Vacanti JP, Ott HC. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med.* 2013;19(5):646-51.

92. Nakayama KH, Lee CC, Batchelder CA, Tarantal AF. Tissue specificity of decellularized rhesus monkey kidney and lung scaffolds. *PLoS One*. 2013;8(5):e64134.
93. Bonandrini B, Figliuzzi M, Papadimou E, Morigi M, Perico N, Casiraghi F, et al. Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(9-10):1486-98.
94. Caralt M, Uzarski JS, Iacob S, Obergfell KP, Berg N, Bijonowski BM, et al. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. *Am J Transplant*. 2015;15(1):64-75.
95. Bissell MJ, Aggeler J. Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression? *Prog Clin Biol Res*. 1987;249:251-62.
96. Hodde JP, Record RD, Liang HA, Badylak SF. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothelium*. 2001;8(1):11-24.
97. Hodde J, Record R, Tullius R, Badylak S. Fibronectin peptides mediate HMEC adhesion to porcine-derived extracellular matrix. *Biomaterials*. 2002;23(8):1841-8.
98. Brennan EP, Reing J, Chew D, Myers-Irvin JM, Young EJ, Badylak SF. Antibacterial activity within degradation products of biological scaffolds composed of extracellular matrix. *Tissue Eng*. 2006;12(10):2949-55.
99. Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng*. 2006;12(3):519-26.
100. Gong J, Sagiv O, Cai H, Tsang SH, Del Priore LV. Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors. *Exp Eye Res*. 2008;86(6):957-65.
101. Sellaro TL, Ranade A, Faulk DM, McCabe GP, Dorko K, Badylak SF, et al. Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(3):1075-82.
102. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng*. 2011;13:27-53.
103. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-43.
104. Petersen TH, Calle EA, Colehour MB, Niklason LE. Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds. *Cells Tissues Organs*. 2012;195(3):222-31.
105. Hodde J, Hiles M. Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method. *Biotechnol Bioeng*. 2002;79(2):211-6.
106. Hodde J, Janis A, Ernst D, Zopf D, Sherman D, Johnson C. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(4):537-43.
107. Cox B, Emili A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1872-8.
108. Xu CC, Chan RW, Tirunagari N. A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria. *Tissue Eng*. 2007;13(3):551-66.
109. Giusti S, Bogetti ME, Bonafina A, Fiszer de Plazas S. An improved method to obtain a soluble nuclear fraction from embryonic brain tissue. *Neurochem Res*. 2009;34(11):2022-9.
110. Elder BD, Kim DH, Athanasiou KA. Developing an articular cartilage decellularization process toward facet joint cartilage replacement. *Neurosurgery*. 2010;66(4):722-7; discussion 7.
111. Du L, Wu X, Pang K, Yang Y. Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(3):410-4.

112. Alhamdani MS, Schroder C, Werner J, Giese N, Bauer A, Hoheisel JD. Single-step procedure for the isolation of proteins at near-native conditions from mammalian tissue for proteomic analysis on antibody microarrays. *J Proteome Res*. 2010;9(2):963-71.
113. Patel N, Solanki E, Picciani R, Cavett V, Caldwell-Busby JA, Bhattacharya SK. Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics. *Proteomics*. 2008;8(5):1055-70.
114. Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;127(2):399-405.
115. Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, Hilfiker A, Dorfman S, Ternes W, et al. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs*. 2010;34(3):206-10.
116. Meyer SR, Chiu B, Churchill TA, Zhu L, Lakey JR, Ross DB. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. *J Biomed Mater Res A*. 2006;79(2):254-62.
117. Lumpkins SB, Pierre N, McFetridge PS. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Acta Biomater*. 2008;4(4):808-16.
118. Yang B, Zhang Y, Zhou L, Sun Z, Zheng J, Chen Y, et al. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(5):1201-11.
119. Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, et al. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*. 2010;31(13):3590-5.
120. Woods T, Gratzner PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials*. 2005;26(35):7339-49.
121. Deeken CR, White AK, Bachman SL, Ramshaw BJ, Cleveland DS, Loy TS, et al. Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;96(2):199-206.
122. Reing JE, Brown BN, Daly KA, Freund JM, Gilbert TW, Hsiong SX, et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2010;31(33):8626-33.
123. Gui L, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE. Novel utilization of serum in tissue decellularization. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(2):173-84.
124. Feil G, Christ-Adler M, Maurer S, Corvin S, Rennekampff HO, Krug J, et al. Investigations of urothelial cells seeded on commercially available small intestine submucosa. *Eur Urol*. 2006;50(6):1330-7.
125. Yang M, Chen CZ, Wang XN, Zhu YB, Gu YJ. Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;91(1):354-61.
126. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*. 2012;33(6):1771-81.
127. Badylak SF, Gilbert TW. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol*. 2008;20(2):109-16.
128. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.
129. Scarritt ME, Pashos NC, Bunnell BA. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3:43.
130. Savickiene J, Treigyte G, Baronaite S, Valiulienė G, Kaupinis A, Valius M, et al. Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells from Second- and Third-Trimester Amniocentesis:

Differentiation Potential, Molecular Signature, and Proteome Analysis. *Stem Cells Int.* 2015;2015:319238.

131. Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, Cheng FC, Lee JL, Chang YJ. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol Reprod.* 2006;74(3):545-51.

132. Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif.* 2007;40(1):75-90.

133. Kolambkar YM, Peister A, Soker S, Atala A, Guldborg RE. Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. *J Mol Histol.* 2007;38(5):405-13.

134. Bollini S, Pozzobon M, Nobles M, Riegler J, Dong X, Piccoli M, et al. In vitro and in vivo cardiomyogenic differentiation of amniotic fluid stem cells. *Stem Cell Rev.* 2011;7(2):364-80.

135. Rosner M, Mikula M, Preitschopf A, Feichtinger M, Schipany K, Hengstschlager M. Neurogenic differentiation of amniotic fluid stem cells. *Amino Acids.* 2012;42(5):1591-6.

136. Vunjak-Novakovic G, Tandon N, Godier A, Maidhof R, Marsano A, Martens TP, et al. Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(2):169-87.

137. Waksman R, Fournadjiev J, Baffour R, Pakala R, Hellinga D, Leborgne L, et al. Transepical autologous bone marrow-derived mononuclear cell therapy in a porcine model of chronically infarcted myocardium. *Cardiovasc Radiat Med.* 2004;5(3):125-31.

138. Lovell MJ, Yasin M, Lee KL, Cheung KK, Shintani Y, Collino M, et al. Bone marrow mononuclear cells reduce myocardial reperfusion injury by activating the PI3K/Akt survival pathway. *Atherosclerosis.* 2010;213(1):67-76.

139. Mazo M, Gavira JJ, Abizanda G, Moreno C, Ecay M, Soriano M, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells exerts a greater long-term effect than bone marrow mononuclear cells in a chronic myocardial infarction model in rat. *Cell Transplant.* 2010;19(3):313-28.

140. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):341-7.

141. Li Y, Charif N, Mainard D, Bensoussan D, Stoltz JF, de Isla N. Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Biomed Mater Eng.* 2014;24(1 Suppl):47-52.

142. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14(8):318-22.

143. Rubart M, Field LJ. Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:29-49.

144. Young PP, Vaughan DE, Hatzopoulos AK. Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;49(6):421-9.

145. Narmoneva DA, Vukmirovic R, Davis ME, Kamm RD, Lee RT. Endothelial cells promote cardiac myocyte survival and spatial reorganization: implications for cardiac regeneration. *Circulation.* 2004;110(8):962-8.

146. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418(6893):41-9.

147. Zeng L, Rahrman E, Hu Q, Lund T, Sandquist L, Felten M, et al. Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. *Stem Cells.* 2006;24(11):2355-66.

148. Aranguren XL, Luttun A, Clavel C, Moreno C, Abizanda G, Barajas MA, et al. In vitro and in vivo arterial differentiation of human multipotent adult progenitor cells. *Blood.* 2007;109(6):2634-42.

149. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 14):2971-81.

150. Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*. 2006;20(5):857-69.
151. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
152. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
153. Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, Jung J. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(6):867-76.
154. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006;208(1):64-76.
155. Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007;16(1):91-104.
156. Boquest AC, Shahdadfar A, Fronsdal K, Sigurjonsson O, Tunheim SH, Collas P, et al. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell*. 2005;16(3):1131-41.
157. De Francesco F, Ricci G, D'Andrea F, Nicoletti GF, Ferraro GA. Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bed-Side. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015.
158. Zuk P. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells*. 2013;2013:1-35.
159. Gimble JM, Bunnell BA, Guilak F. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regen Med*. 2012;7(2):225-35.
160. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Il, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16(3):381-90.
161. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
162. Kang R, Zhou Y, Tan S, Zhou G, Aagaard L, Xie L, et al. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells retain adequate osteogenicity and chondrogenicity but less adipogenicity. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):144.
163. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015.
164. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389-97.
165. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevas CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24(1):74-85.
166. Sundin M, Ringden O, Sundberg B, Nava S, Gotherstrom C, Le Blanc K. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*. 2007;92(9):1208-15.
167. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*. 2004;13(3):263-71.
168. Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X, et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*. 2009;113(1):46-57.

169. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-72.
170. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol*. 2009;37(5):604-15.
171. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107(4):1484-90.
172. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
173. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(1):149-60.
174. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*. 2003;101(8):2999-3001.
175. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*. 2014;54(5):1418-37.
176. Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):203-9.
177. Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, Graf EM, Christ T, Boxberger S, et al. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Res*. 2006;16(12):949-60.
178. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103(5):697-705.
179. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(7):623-31.
180. Moscoso I, Centeno A, Lopez E, Rodriguez-Barbosa JI, Santamarina I, Filgueira P, et al. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant Proc*. 2005;37(1):481-2.
181. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*. 2003;75(3):775-9.
182. Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314(2):420-7.
183. Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*. 2004;94(2):223-9.
184. Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, Arunothayaraj S, Han XL, Collas P, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*. 2010;14(4):878-89.
185. Chang W, Lim S, Song BW, Lee CY, Park MS, Chung YA, et al. Phorbol myristate acetate differentiates human adipose-derived mesenchymal stem cells into functional cardiogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;424(4):740-6.
186. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M. In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(2):639-47.

187. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005;111(2):150-6.
188. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
189. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(32):11474-9.
190. Martens TP, See F, Schuster MD, Sondermeijer HP, Hefti MM, Zannettino A, et al. Mesenchymal lineage precursor cells induce vascular network formation in ischemic myocardium. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3 Suppl 1:S18-22.
191. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. 2002;73(6):1919-25; discussion 26.
192. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003;425(6961):968-73.
193. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*. 2004;10(5):494-501.
194. Zhang HT, Liu ZL, Yao XQ, Yang ZJ, Xu RX. Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Cytotherapy*. 2012;14(10):1203-14.
195. Wang B, Wang G, To F, Butler JR, Claude A, McLaughlin RM, et al. Myocardial scaffold-based cardiac tissue engineering: application of coordinated mechanical and electrical stimulations. *Langmuir*. 2013;29(35):11109-17.
196. Mimeault M, Batra SK. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev*. 2008;4(1):27-49.
197. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
198. Momtahan N, Sukavaneshvar S, Roeder BL, Cook AD. Strategies and processes to decellularize and recellularize hearts to generate functional organs and reduce the risk of thrombosis. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015;21(1):115-32.
199. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med*. 2011;17(8):424-32.
200. Scarritt ME, Pashos NC, Bunnell BA. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. Tables S1-S5 supplemental data. . *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3:43.
201. Arkadopoulos N, Lilja H, Suh KS, Demetriou AA, Rozga J. Intrasplenic transplantation of allogeneic hepatocytes prolongs survival in anhepatic rats. *Hepatology*. 1998;28(5):1365-70.
202. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl*. 2000;6(1):32-40.
203. Kobayashi N, Miyazaki M, Fukaya K, Inoue Y, Sakaguchi M, Uemura T, et al. Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. *Transplantation*. 2000;69(2):202-7.
204. Frith JE, Mills RJ, Hudson JE, Cooper-White JJ. Tailored integrin-extracellular matrix interactions to direct human mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells Dev*. 2012;21(13):2442-56.

205. Somers P, Robyns L, Nollet E, De Somer F, Cornelissen M, Thierens H, et al. Platelet gel supernatant as a potential tool to repopulate acellular heart valves. *Cell Prolif.* 2012;45(4):378-85.
206. Ota T, Sawa Y, Iwai S, Kitajima T, Ueda Y, Coppin C, et al. Fibronectin-hepatocyte growth factor enhances reendothelialization in tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(5):1794-801.
207. Ratcliffe A, Niklason LE. Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;961:210-5.
208. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2004;22(2):80-6.
209. Martin I, Smith T, Wendt D. Bioreactor-based roadmap for the translation of tissue engineering strategies into clinical products. *Trends Biotechnol.* 2009;27(9):495-502.
210. Nahmias Y, Kramvis Y, Barbe L, Casali M, Berthiaume F, Yarmush ML. A novel formulation of oxygen-carrying matrix enhances liver-specific function of cultured hepatocytes. *FASEB J.* 2006;20(14):2531-3.
211. Tolboom H, Pouw R, Uygun K, Tanimura Y, Izamis ML, Berthiaume F, et al. A model for normothermic preservation of the rat liver. *Tissue Eng.* 2007;13(8):2143-51.
212. Qiu Y, Hearse DJ. Comparison of ischemic vulnerability and responsiveness to cardioplegic protection in crystalloid-perfused versus blood-perfused hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;103(5):960-8.
213. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, et al. Functional arteries grown in vitro. *Science.* 1999;284(5413):489-93.
214. Clause KC, Liu LJ, Tobita K. Directed stem cell differentiation: the role of physical forces. *Cell Commun Adhes.* 2010;17(2):48-54.
215. Zheng W, Xie Y, Zhang W, Wang D, Ma W, Wang Z, et al. Fluid flow stress induced contraction and re-spread of mesenchymal stem cells: a microfluidic study. *Integr Biol (Camb).* 2012;4(9):1102-11.
216. Vandenburgh HH, Karlisch P, Farr L. Maintenance of highly contractile tissue-cultured avian skeletal myotubes in collagen gel. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1988;24(3):166-74.
217. Terracio L, Miller B, Borg TK. Effects of cyclic mechanical stimulation of the cellular components of the heart: in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1988;24(1):53-8.
218. Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, et al. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J.* 1997;11(8):683-94.
219. Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, et al. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med.* 2006;12(4):452-8.
220. Witzenburg C, Raghupathy R, Kren SM, Taylor DA, Barocas VH. Mechanical changes in the rat right ventricle with decellularization. *J Biomech.* 2012;45(5):842-9.
221. Remlinger NT, Wearden PD, Gilbert TW. Procedure for decellularization of porcine heart by retrograde coronary perfusion. *J Vis Exp.* 2012(70):e50059.
222. Merna N, Robertson C, La A, George SC. Optical imaging predicts mechanical properties during decellularization of cardiac tissue. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013;19(10):802-9.
223. Sanchez PL, Fernandez-Santos ME, Costanza S, Rodríguez-Abella H, Kren S, Garrido G, et al. Characterization and Biocompatibility of Perfusion-Decellularized Human Heart Matrix: Toward Bioengineering Perfusable Human Heart Grafts. *Journal of the American College of Cardiology.* 2012;59(13):E857.
224. Guyette JP, Song JJ, Chuang W, Ng R, Charest JM, Gaudette GR, et al. Decellularizing Human Hearts: Characterizing Native Cardiac Matrix for Clinical Translation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2013;32(4):S45.

225. Guyette JP, Gilpin SE, Charest JM, Tapias LF, Ren X, Ott HC. Perfusion decellularization of whole organs. *Nat Protoc.* 2014;9(6):1451-68.
226. Momtahan N, Sukavaneshvar S, Roeder B.L., Barrow J.R., Pitt W.G., and Cook A.D. . Novel thrombogenicity analysis of decellularized cardiac organs. . Presented at the TERMIS-AM, Atlanta, GA, 2013. 2013.
227. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature.* 2008;453(7194):524-8.
228. Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib IH, et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2007;100(2):263-72.
229. van Laake LW, Passier R, Doevendans PA, Mummery CL. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and cardiac repair in rodents. *Circ Res.* 2008;102(9):1008-10.
230. Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells.* 2008;26(9):2201-10.
231. Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324(2):481-8.
232. Yoon J, Min BG, Kim YH, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. *Acta Cardiol.* 2005;60(3):277-84.
233. Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, Kresh JY. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126(1):124-32.
234. Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, Potapova I, Zuckerman J, Walcott B, et al. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *J Physiol.* 2004;555(Pt 3):617-26.
235. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1222-32.
236. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1210-21.
237. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1199-209.
238. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;367(9505):113-21.
239. Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R, et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation.* 2005;112(12):1748-55.
240. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114(6):763-76.
241. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(21):12313-8.
242. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, et al. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol.* 2004;265(1):262-75.

243. Pfister O, Mouquet F, Jain M, Summer R, Helmes M, Fine A, et al. CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res*. 2005;97(1):52-61.
244. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*. 2005;433(7026):647-53.
245. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007;115(7):896-908.
246. Zhao B, Chen S, Liu J, Yuan Z, Qi X, Qin J, et al. Cardiac telocytes were decreased during myocardial infarction and their therapeutic effects for ischaemic heart in rat. *J Cell Mol Med*. 2013;17(1):123-33.
247. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 2010;142(3):375-86.
248. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95(9):911-21.
249. Sanchez PL, San Roman JA, Villa A, Fernandez ME, Fernandez-Aviles F. Contemplating the bright future of stem cell therapy for cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3 Suppl 1:S138-51.
250. Gilbert TW. Strategies for tissue and organ decellularization. *J Cell Biochem*. 2012;113(7):2217-22.
251. MacKenna DA, Omens JH, McCulloch AD, Covell JW. Contribution of collagen matrix to passive left ventricular mechanics in isolated rat hearts. *Am J Physiol*. 1994;266(3 Pt 2):H1007-18.
252. Jobsis PD, Ashikaga H, Wen H, Rothstein EC, Horvath KA, McVeigh ER, et al. The visceral pericardium: macromolecular structure and contribution to passive mechanical properties of the left ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(6):H3379-87.
253. Burkhoff D, Mirsky I, Suga H. Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(2):H501-12.
254. Rajabi-Zeleti S, Jalili-Firoozinezhad S, Azarnia M, Khayyatan F, Vahdat S, Nikeghbalian S, et al. The behavior of cardiac progenitor cells on macroporous pericardium-derived scaffolds. *Biomaterials*. 2014;35(3):970-82.
255. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med*. 2013;19(1):35-42.

9. Anexos



Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts



Pedro L. Sánchez ^{a, b, c, 1}, M. Eugenia Fernández-Santos ^{b, d}, Salvatore Costanza ^{b, e}, Andreu M. Climent ^b, Isabel Moscoso ^f, M. Angeles Gonzalez-Nicolas ^b, Ricardo Sanz-Ruiz ^{a, b}, Hugo Rodríguez ^d, Stefan M. Kren ^g, Gregorio Garrido ^h, Jose L. Escalante ⁱ, Javier Bermejo ^a, Jaime Elizaga ^a, Javier Menarguez ^j, Raquel Yotti ^a, Candelas Pérez del Villar ^a, M. Angeles Espinosa ^{a, b}, María S. Guillem ^b, James T. Willerson ^k, Antonio Bernad ^f, Rafael Matesanz ^h, Doris A. Taylor ^{b, k, **, 1}, Francisco Fernández-Avilés ^{a, b, *, 1}

^a Department of Cardiology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IiSGM), Madrid, Spain

^b Bioartificial Organs Laboratory, Department of Cardiology, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Gregorio Marañón (IiSGM), Madrid, Spain

^c Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, Salamanca, Spain

^d Cell Production Unit, Department of Cardiology, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Gregorio Marañón (IiSGM), Madrid, Spain

^e Department of Cardiac Surgery, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IiSGM), Madrid, Spain

^f Department of Cardiovascular Development and Repair, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Instituto de Salud Carlos III, Spain

^g Center for Cardiovascular Repair, University of Minnesota, Minneapolis, USA

^h National Transplant Organization (ONT), Spanish Ministry of Health and Consumption, Spain

ⁱ Solid Organ Transplantation Program, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^j Department of Pathology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Gregorio Marañón (IiSGM), Madrid, Spain

^k Regenerative Medicine Research, Texas Heart Institute, Houston, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 January 2015

Received in revised form

22 April 2015

Accepted 30 April 2015

Available online 13 May 2015

Keywords:

Cells

Tissue

Myocardium

Cardiovascular diseases

ABSTRACT

The best definitive treatment option for end-stage heart failure currently is transplantation, which is limited by donor availability and immunorejection. Generating an autologous bioartificial heart could overcome these limitations. Here, we have decellularized a human heart, preserving its 3-dimensional architecture and vascularity, and recellularized the decellularized extracellular matrix (dECM). We decellularized 39 human hearts with sodium-dodecyl-sulfate for 4–8 days. Cell removal and architectural integrity were determined anatomically, functionally, and histologically. To assess cytocompatibility, we cultured human cardiac-progenitor cells (hCPC), bone-marrow mesenchymal cells (hMSCs), human endothelial cells (HUECs), and H9c1 and HL-1 cardiomyocytes in vitro on dECM ventricles up to 21 days. Cell survival, gene expression, organization and/or electrical coupling were analyzed and compared to conventional 2-dimensional cultures. Decellularization removed cells but preserved the 3-dimensional cardiac macro and microstructure and the native vascular network in a perfusable state. Cell survival was observed on dECM for 21 days. hCPCs and hMSCs expressed cardiocyte genes but did not adopt cardiocyte morphology or organization; HUECs formed a lining of endocardium and vasculature; differentiated cardiomyocytes organized into nascent muscle bundles and displayed mature calcium dynamics and electrical coupling in recellularized dECM. In summary, decellularization of human hearts provides a biocompatible scaffold that retains 3-dimensional architecture and vascularity and that can be recellularized with parenchymal and vascular cells. dECM promotes cardiocyte gene expression in stem

* Corresponding author. Department of Cardiology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain.

** Corresponding author. Regenerative Medicine Research, Texas Heart Institute, Houston TX, USA.

E-mail addresses: dtaylor@texasheart.org (D.A. Taylor), faviles@secardiologia.es (F. Fernández-Avilés).

¹ Drs. Fernández-Avilés and Taylor contributed equally to this work as senior authors.

cells and organizes existing cardiomyocytes into nascent muscle showing electrical coupling. These findings represent a first step toward manufacturing human heart grafts or matrix components for treating cardiovascular disease.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Heart disease is the leading cause of death in the United States and throughout most of the world [1,2]. In the US, heart failure, the final stage of most heart diseases, directly causes approximately 60,000 deaths each year [2]. Despite improvements in medical and device therapy, heart transplantation remains the definitive option for patients with end-stage heart failure. Although the incidence and prevalence of heart failure are increasing, the number of heart transplants has reached a plateau. In the US, 3985 patients were on the active waiting list for a heart transplant in 2013—a 28% increase from 2004. During this same period, the number of donors increased by only 19%, to 2582 in 2013 [3,4]. A similar trend has been seen in Europe, even in Spain, which has the highest organ donation rate in the world [5]. One possible solution to address this issue is the development of engineered cardiac tissue that can replace damaged myocardium or induce endogenous cardiac repair.

A primary goal of research in cardiac tissue engineering is to restore left ventricular function [6]. Experimental biomaterial therapies have focused on the replacement of necrotic cardiomyocytes and/or the repair of damaged extracellular matrix [7,8]. Such approaches have included applying cardiac patches, derived from synthetic or natural materials, to the epicardial surface or injecting them directly into the myocardium to improve wall stress [7,8]. The patches can contain cells, genes, or small molecules that are used to replace necrotic tissue or to recruit reparative cells for improving wound healing. These types of patches have been simple sheets of cells that are 1–3 cell-layers thick or gels that contain isolated disorganized cells, genes, or molecules.

One of the major challenges in cardiac tissue engineering is producing a thick cardiac tissue that can meet the high oxygen demands—and thus the need for significant perfusion—of cardiac cells. We hypothesized that the process of detergent perfusion [9] could be applied to non-transplantable adult human hearts to yield a decellularized, 3-D cardiac extracellular matrix (dECM) with a preserved vascular tree that could then be used to build an organized, thick cardiac tissue. To test this hypothesis, we applied our perfusion decellularization technique to whole human hearts [9] and evaluated the 3-D architecture, chamber geometry, mechanical anisotropy, and the integrity of large diameter vessels and the microvascular networks of the decellularized hearts. We also tested the cytocompatibility of the resulting dECM for human stem cells and the ability to generate organized electrically-coupled nascent cardiac tissue with the use of parenchymal and vascular cell lines. We believe this study demonstrates a major step toward the manufacture of perfusable human heart grafts.

1. Methods

1.1. Donor heart harvest

Between May 2010 and June 2013, we harvested 52 human hearts that were determined by the Spanish National Transplant Organization (ONT) as not suitable for transplantation. The ONT is part of the Spanish Ministry of Health and Consumption and is in

charge of coordinating the donation, extraction, preservation, distribution, exchange, and transplantation of organs, tissues, and cells throughout the Spanish Health Care System.

Approval for all studies was obtained from the relevant investigation and ethics committees of the Hospital General Universitario Gregorio Marañón and from the ONT. The relatives of each donor were provided an informational brochure stating that the heart would be used for this investigational purpose.

After approval was obtained and other organs suitable for transplantation were explanted, we used standard transplantation protocols to remove the heart. Briefly, a median sternotomy was performed to expose the mediastinum, the pericardium was opened, and the great vessels were dissected including the pulmonary veins. The hearts were maintained in cardioplegia or saline at 4 °C until decellularization was performed within 1–5 days of harvest.

1.2. Heart decellularization

We used our previously described perfusion decellularization protocol to remove the cells from the heart while retaining the dECM [9]. The hearts were perfused with 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) in deionized water via antegrade flow through the ascending aorta; perfusion was stopped at day 4–8 according to a randomized table. The hearts were then rinsed extensively with approximately 20 L of phosphate-buffered saline (PBS). To determine the extent of cell removal and the retention of parenchymal and vascular structures, we analyzed the structure (gross anatomy), function (optical coherence tomography [OCT], angiography, vascular perfusion, echocardiography, endoscopy, and pressure-volume [PV] analyses), histology (hematoxylin and eosin [H&E], Masson's trichrome, silver staining), and ultrastructure (SEM) of the hearts. Thirteen hearts were not decellularized and served as cadaveric controls.

1.3. Structure and function analyses

The characteristics of the chambers and valves of the scaffolds were assessed by using endoscopy (Pentax CK 1570 bronchofibroscope) and transthoracic echocardiography (General Electric Vivid 7 system model). During endoscopy, access via the ascending aorta was used to visualize the aortic valve, left ventricle, mitral valve and left atria, whereas pulmonary artery access was used to evaluate the right ventricle, tricuspid valve, and right atria. During echocardiography, the scaffolds were submerged in deionized water, which served as an acoustic interface. We obtained images from the epicardium with a broadband 14 MHz transducer.

The anatomical aspects of the decellularized cardiac vessels were assessed by using coronary angiography. The procedure was performed via the left and right coronary arteries. OCT of the left anterior descending artery (LAD) was performed with an interface unit (C-7 System, LightLab Imaging Inc., Westford, MA, USA). A 2.7-French catheter was delivered over a conventional (0.014-inch) coronary guidewire. An imaging run was performed from the distal to the proximal LAD using an automated pullback at 20.0 mm/s and, the OCT images were taken at 100 frames/second.

The anatomical and functional aspects of the native vasculature were determined by bubble contrast echocardiography and blood infusion. A single coronary infusion of bubble contrast (20 ml) into the catheterized left main coronary artery was used to visualize the integrity of the microvasculature. Then, infusion of human peripheral blood was used to assess the integrity of the epicardial conduit vessels and the retention of microvascular perfusate in the depths of the matrix.

Finally, gross anatomy was evaluated visually in sagittal heart sections before histological analysis.

1.4. Histology and ultrastructural analysis

To evaluate the structural integrity of the scaffolds and document the removal of cells, we examined the decellularized hearts by using light optical microscopy, scanning and transmission electron microscopy, and laser-scanning confocal microscopy.

Samples from decellularized and non-decellularized hearts were fixed with 10% formalin and embedded in paraffin. We obtained 10- μ m sections of epicardial fat, atria, ventricles, intraventricular septum, great vessels, coronary arteries, and valves and stained them with H&E, Masson's trichrome, or silver solution. To evaluate the dECM integrity and composition, we stained the samples with antibodies (Roche Diagnostics) against collagen I and IV and elastin. The sections were imaged using Leica DMD 108 optical microscopy.

For the ultrastructural analysis, samples from decellularized and non-decellularized hearts were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 24 h at room temperature. For scanning electron microscopy (SEM), the samples were post-fixed with osmium tetroxide, dehydrated with increasing ethanol concentrations, dried in a critical-point dryer, and sputter-coated with gold. The samples were visualized using a JEOL JSM-T300 SEM. For transmission electron microscopy (TEM), solid tissue was cut into 1 mm³ blocks, post-fixed with osmium tetroxide, and stained en bloc with uranyl acetate followed by lead citrate, dehydrated with increasing concentrations of ethanol, and embedded in resin. The blocks were positioned in the ultramicrotome and mechanically trimmed using a glass knife. Semi-thin sections obtained were stained with methylene blue and viewed on bright-field microscopy. Ultra-thin (~80 nm) sections were evaluated on a JEOL 100 SX microscope. Finally, to further evaluate cell removal, we obtained images of DAPI-stained decellularized samples by laser-scanning confocal microscopy with an Ultra-spectral Leica TCS-SP2-AOBS inverted epifluorescence microscope.

To document removal of nuclear components, we quantified the DNA yield from cadaveric tissue and the dECM. DNA was purified, from 25 to 50 mg of cadaveric or decellularized tissues by using a commercial kit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics). The DNA concentration was estimated by measuring the absorbance at 260 nm with a spectrophotometer (Nanophotometer Pearl, IMPLLEN).

1.5. Passive mechanical properties

The passive PV relationship of the left and right ventricle was measured in 8 human hearts before and after decellularization. Non-compliant polyethylene balloons were inserted across the aortic or pulmonary valves and hermetically attached to a 5-French intravascular sheath. The mitral and tricuspid leaflets were sutured in a fully closed position. A 5-French high-fidelity micromanometer (Millar-Instruments) was placed inside the balloon and connected to a 3-port manifold. Pressure and volume were modified by aspiration, followed by slow injection of isotonic saline with the use of 60-ml syringes attached to the manifold. The hearts and scaffolds

were suspended from a ringstand and immersed in a temperature-controlled saline bath at 36 °C. To obtain transmural chamber pressure, we placed a second micromanometer catheter in the bath after balancing, at the same depth as the intraventricular sensor. The pressure data were digitally acquired continuously at 1000 Hz, whereas the injected volume was recorded at 1-ml intervals as the saline was injected from the syringe to a peak pressure of 30 mmHg. The final intraballoon volume was considered the total volume infused. Measurements for the right and left ventricles were obtained separately while the contralateral ventricle was empty. At the end of the experiments, a constant value of zero transmural pressure inside each bag was certified for the range of volumes explored.

Exponential fitting was applied to the PV relationship analysis as follows:

$$P = a + be^{c(V-V_0)}$$

In this equation, a is the pressure asymptote, b and c are characteristic material coefficients, and V_0 is the equilibrium volume. The major shortcoming of this approach is that chamber stiffness (dP/dV) is a function of volume and, therefore, a function of ventricle size; thus, it is not simply a material property. To overcome this, we calculated the slope of the fitted curve at the equilibrium volume as a stiffness parameter to compare between samples.

1.6. Cytocompatibility

1.6.1. Recellularization of dECM in vitro

To test the cytocompatibility of the perfusion-decellularized whole human heart dECM, we labeled human c-Kit + cardiac progenitor cells (hCPCs) (donated by Coretherapix, Madrid, Spain), human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs) (donated by Cell Production Unit, IISGM, Madrid, Spain), human umbilical-vein endothelial cells (HUEVCs) (ATCC, United Kingdom), H9c2 rat cardiomyocytes (ATCC, United Kingdom), and HL-1 cardiomyocytes (donated by Dr. William C. Claycomb, Louisiana State University Medical Center, New Orleans, USA) with 5 μ M DiI and DAPI and cultured them on slices of decellularized human left ventricle for up to 21 days. We seeded cells at 3 densities (5×10^4 , 10×10^4 , and 30×10^4 cells) in 20 μ l of culture medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum onto the decellularized tissue. After a 2-h incubation at 37 °C in 5% CO₂, we added 1–2 ml of medium and increased the volume after 24 h to cover the dECM. The medium was changed every 2–3 days up to 21 days. Histologic sections were evaluated at 1, 5, and 21 days.

1.6.2. Cardiac gene expression profiling

The effect of human ventricular dECM on the differentiation of hCPCs and hMSCs into cardiomyocyte-like cells was analyzed and compared in parallel to cell differentiation in conventional 2D cultures. The hCPCs were obtained from human cardiac biopsy specimens as previously described [10]. Bone marrow samples were obtained from iliac crest aspirates of healthy individuals, and hMSCs were isolated, purified, and expanded according to standard protocols [11]. For QRT-PCR analysis, cDNA first strands were synthesized from 1 μ g total RNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Genes of interest were measured by quantitative RT-PCR using Power SYBR Green reagents (Applied Biosystems). The cycle conditions were 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The quantified values were normalized to the expression of GusB.

1.6.3. Electrical coupling

Electrical coupling between cells reseeded in the dECM was assessed by calcium transient imaging. Cells on dECM were stained by immersion in Claycomb culture medium containing rhod-2 AM (Ca²⁺ sensitive probe, TEFLabs, Inc, Austin, TX, USA) dissolved in DMSO (1 mM stock solution; 3.3 μ l per ml in culture medium) and Probenecid (TEFLabs, Inc, Austin, TX, USA) for 30 min under incubation conditions. After the dye incubation, the culture medium was changed to fresh modified Krebs solution at 36.5 °C (containing in mM: NaCl, 120; NaHCO₃, 25; CaCl₂, 1.8; KCl, 5.4; MgCl₂, 1; glucose, 5.5; H₂O₄PNa•H₂O, 1.2). To excite rhod-2 AM, we illuminated dECM plus cells with a filtered green LED light source: LED: CBT-90-G (peak power output 58 W; peak wavelength 524 nm; Luminus Devices, Billerica, USA) with a plano-convex lens (LA1951; focal length = 25.4 mm; Thorlabs, New Jersey, USA) and a green excitation filter (D540/25X; Chroma Technology, Bellows Falls, USA). Two such light sources were used to achieve a homogeneous illumination. Fluorescence was recorded with an electron-multiplying charge-coupled device (EMCCD; Evolve-128; 128×128, 24×24 μ m-square pixels, 16 bit; Photometrics, Tucson, AZ, USA) with a custom emission filter (ET585/50-800/200M; Chroma Technology) suitable for rhod-2AM emission placed in front of a high-speed camera lens (DO-2595; Navitar Inc., Rochester, USA). Cell constructs were stimulated at 1 Hz by using a bipolar pulse of 2 ms. Custom software written in MATLAB (MathWorks) was used to estimate activation times and to construct propagation maps.

To verify electrical coupling, cells on dECM were fixed with PBS with 4% paraformaldehyde (PFA), paraffin embedded, sectioned (4–5 μ m), and permeabilized with 0.25% Triton X-100. After blocking with PBS containing 1% BSA, the sections were incubated with a primary antibody (1:75 dilution; Sigma Aldrich) against connexin-43 for 30 min at room temperature and rinsed with PBS. Secondary antibody labeling was performed for 30 min with specific FITC-labeled antibody (1:100 dilution; Bethyl). The nuclei were visualized by DAPI staining (Sigma Aldrich). The immunolabeled recellularized dECM was mounted with Fluorescence Mounting Medium (Dako) and observed on a Leica DM3000 microscope (Leica Microsystems).

2. Results

2.1. Structural integrity and removal of cells

The characteristics of the donor, the donor and decellularized hearts, and the decellularization process are shown. Cadaveric hearts could be stored up to 5 days at 4 °C in saline before decellularization with no obvious deleterious effect on the final matrix. Hearts weighing from 250 to 700 g could be decellularized over 4 days; increasing the decellularization period to 8 days provided no obvious benefit, even in large hearts. Decellularization began in the thinnest regions (ie, great vessels and auricles) and proceeded through the intermediate regions (ie, right ventricle, valves) to the thickest areas (ie, left ventricle, interventricular septum). During this process, there was a visible loss of color in the great vessels and muscular areas, resulting in a translucent scaffold by 4 days that retained the gross shape of the heart (Fig. 1A,B) and approximately 85% of the original mass.

To evaluate the decellularized heart in situ before dissection, we used several clinical imaging techniques. Endoscopy (Fig. 1C–F and Video 1) showed integrity of the valves, all 4 chambers, the papillary muscles, and even fine structures such as the chordae tendineae and valve leaflets. On histologic study, we identified the brown color visualized in some regions as lipofuscin deposits. Echocardiography and endoscopy (Fig. 1G–I and

Videos 1–3) demonstrated the patency of the aortic and pulmonary valves, showed the competency of cardiac valves, and demonstrated retention of the normal circumferential alignment of myocardial fibers throughout the ventricular wall after decellularization.

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.056>.

Grossly, after dissection, the decellularized hearts appeared lighter in color than the cadaveric control hearts, but we could not determine whether they were acellular simply by visual inspection (Fig. 1J,K). Macroscopically, the scaffold retained both the gross and fine structures (eg, valves, chordae) of the cadaveric heart, as was previously indicated by endoscopy.

On histologic evaluation, when compared to cadaveric hearts (Fig. 2A–C), the chambers and great vessels of the decellularized hearts showed a complete loss of cellular components including nuclei and cytoplasmic components as illustrated on representative images of the ascending aorta, intraventricular septum, pulmonary valve, tricuspid valve, coronary arteries or left atrium (Fig. 2D–I). Nuclear material was not visible in H&E-stained tissue sections, and residual DNA content in the dECM was less than 5%, with <50 ng dsDNA per mg dECM weight and <200 bp DNA fragment length (Fig. 2J); these results indicate that our approach met the established criteria of decellularization [12]. Masson's trichrome, silver staining, and immunostaining of the decellularized scaffold indicated that both the structural and basement membrane components of the extracellular matrix (collagen, fibronectin, and laminin) were retained (Fig. 3A–C) similar to those in the native heart. Moreover, scanning and transmission electron microscopy confirmed the absence of cellular components and the retention of matrix fiber orientation throughout the heart compared with control cadaveric hearts (Fig. 3D–F).

To evaluate the functional integrity of the dECM, we conducted PV measurements (Fig. 3G). Pre- and post-decellularization passive PV curves showed a characteristic exponential shape. As expected after decellularization [9], compliance decreased in both the left and right ventricles (pre- and post-decellularization dP/dV for the left ventricle: 0.84 [95% CI: 0.55–1.13] versus 0.12 [0–0.41] mm Hg/ml, respectively, $P < 0.001$; right ventricle: 0.27 [0.14–0.4] versus 0.12 [0–0.25] mm Hg/ml, $P < 0.01$). However, the stiffness of the left ventricle did not differ significantly from that of the right ventricle ($p = 0.7$), except at higher volumes where the left ventricle was stiffer. Therefore, the higher stiffness of the left ventricle at the equilibrium volume is due to differences in the cellular component and not in the extracellular scaffold.

2.2. Vascular integrity

Conventional coronary angiography (Fig. 4A and Video 4) and echocardiography after contrast perfusion (Fig. 4B and Video 5) showed that the decellularization protocol preserved the functionality of the epicardial and myocardial vascular beds. OCT demonstrated the preservation of the LAD arterial layers (Fig. 4C and Video 6). Finally, perfusion of human blood into the left main coronary artery and visualization of epicardial flow showed the intravascular retention of blood (Fig. 2D,E and Video 7). On histologic examination of decellularized scaffolds, we could visualize both large and small-diameter vascular conduits in H&E and trichrome-stained images, with complete loss of cellular components compared to cadaveric controls (Fig. 4F–H).

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.056>.

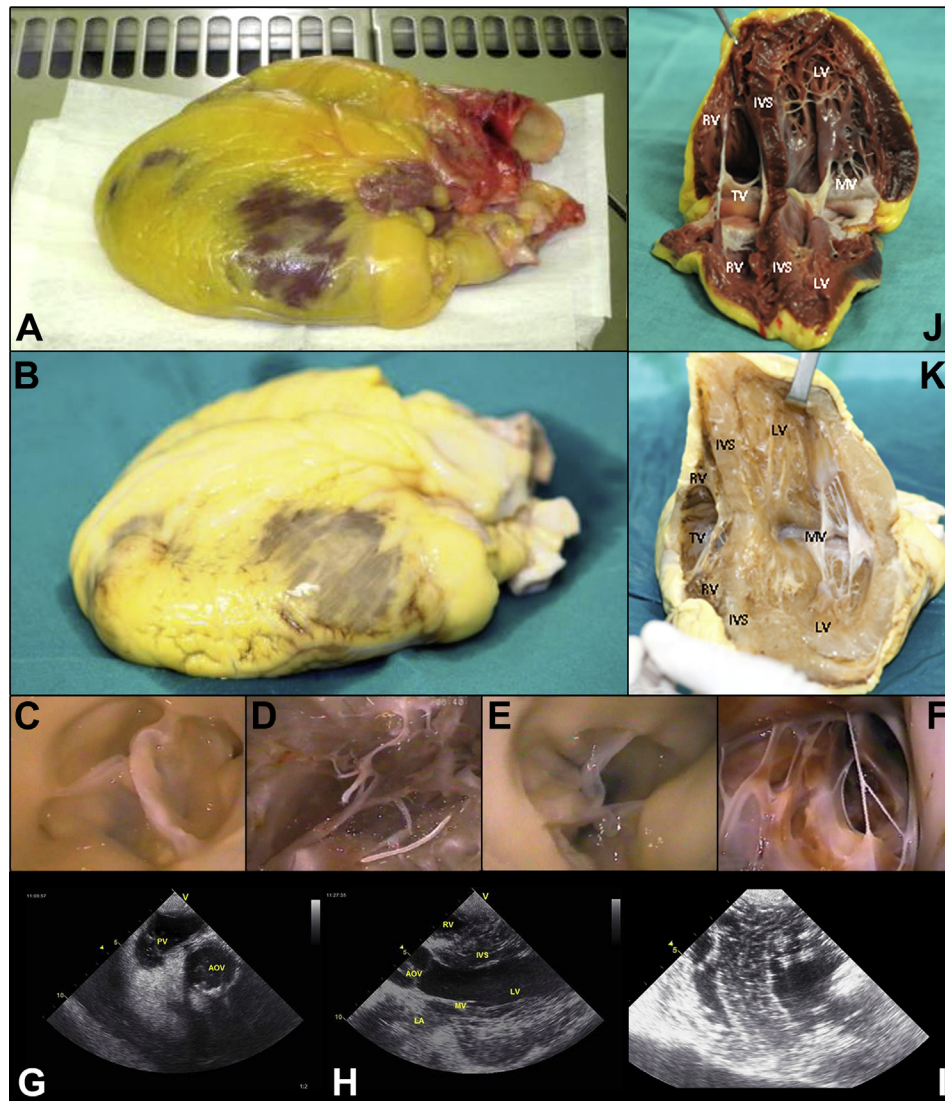


Fig. 1. Structural integrity of the decellularized scaffold. The gross shape of the original heart (Panel A) is retained after 96 h of decellularization (Panel B). Endoscopy of the decellularized heart matrix showing integrity of the aortic valve (Panel C), left ventricle chamber with papillary muscle matrix and chordae tendineae (Panel D), pulmonary valve (Panel E), and right ventricle chamber trabeculae (Panel F). Echocardiography (Panels G to I) demonstrating integrity of the pulmonary valve (PV), aortic valve (AOV), mitral valve (MV), left atrium (LA), left ventricle (LV), interventricular septum (IVS), and right ventricle (RV) and retention of normal circumferential myocardial fiber disposition. Macroscopic 3-dimensional anatomy of a whole non-decellularized control heart (Panel J) and a whole decellularized heart matrix (Panel K) opened in a sagittal or longitudinal horizontal plane showing the left ventricle (LV) and right ventricle (RV) separated by the interventricular septum (IVS) and both atrioventricular valves (mitral valve [MV] and tricuspid valve [TV]).

2.3. Cytocompatibility

2.3.1. Cell alignment and distribution

hMSCs and hCPCs were used to evaluate the ability of the dECM to drive cell commitment and differentiation *in vitro*; HUVECs and the cardiomyocyte cell lines H9c2 and HL1 were used to evaluate the mature cell response to dECM (Fig. 5).

At 24 h, DiI-labeled hMSCs or hCPCs were rounded and had dispersed over the surface of the matrix, appearing to be primarily on top of the cardiac dECM. By 48 h, the hMSCs had enlarged and begun to infiltrate the matrix slice. At 21 days, Masson's trichrome staining showed that hMSCs had infiltrated into the matrix with evidence of enlargement but incomplete cell alignment. In contrast, hCPCs rarely infiltrated the matrix and showed no evidence of changes in cell appearance or alignment. Initially, HUVECs were found on the surface of the matrix but did not appear to adhere strongly. Instead, they migrated over time to localize primarily

within large-diameter cardiac vessels in the matrix milieu and on the endocardial surface of the dECM; a few were found in small-diameter vessels within the slices. The cardiomyocyte H9c2 and HL1 cells attached to the matrix on day 1, began to align, and over time organized and elongated. By day 21, they were organized into what appeared to be muscle islands surrounded by matrix. Their organization resembled muscle bundles on cross-section and muscle fibers on longitudinal sections (Fig. 5S, T, Y, Z). The only stem or progenitor cell types that showed a similar propensity were the hMSCs, which began to organize by day 21.

2.3.2. Cell differentiation

To test the hypothesis that cardiac dECM could drive stem/progenitor cell differentiation, we grew hMSCs (data not shown) and c-kit + hCPCs on slices of left and right ventricular dECM or gelatin for 21 days. Then, we performed qRT-PCR for cardiac transcription factors and myocyte markers (cardiac beta myosin heavy

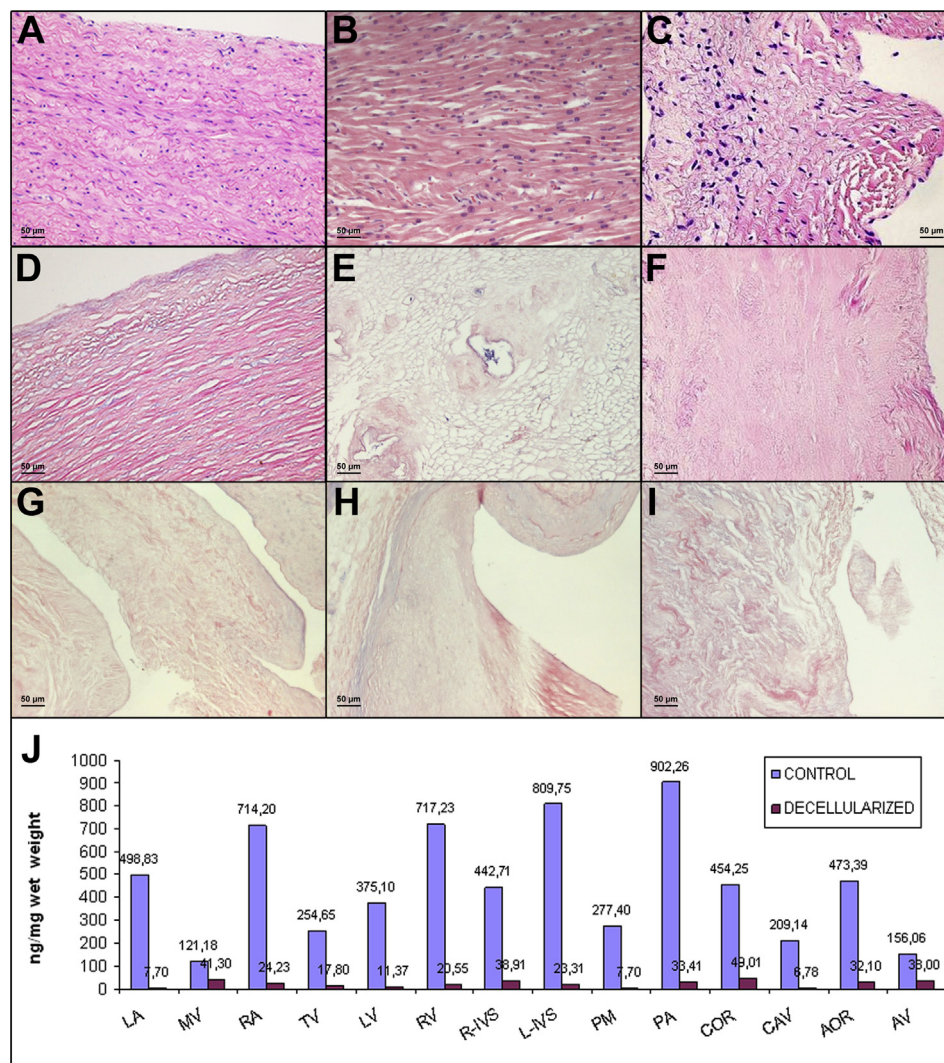


Fig. 2. Histologic and DNA analyses demonstrating cell removal. Hematoxylin and eosin–stained sections (20×) showing non-decellularized samples of an ascending aorta (Panel A), interventricular septum (Panel B), and pulmonary valve (Panel C) compared with decellularized ascending aorta (Panel D), interventricular septum (Panel E), pulmonary valve (Panel F), tricuspid valve (Panel G), left descending coronary artery (Panel H), left atrium (Panel I) samples. DNA quantification (Panel J) for control (purple color) and decellularized (blue color) samples: left atria (LA), mitral valve (MV), right atria (RA), tricuspid valve (TV), left ventricle (LV), right ventricle (RV), right interventricular septum (R–IVS), left interventricular septum (L–IVS), pulmonary valve (PM), pulmonary artery (PA), coronary artery (COR), vena cava (CAV), and ascending aorta (AOR). The quantification of DNA content was for control and decellularized hearts as follows (mean ± standard deviation): 413 ± 262 vs 34 ± 29 , $p < 0.001$.

chain, bMHC; MEF2C; Nkx2.5; and cardiac troponin T; TnnT). Growing hCPCs on both right and left ventricular dECM promoted upregulation of Nkx2.5, TnnT and bMHC compared to growth on gelatin. Cardiac gene expression increased to a greater degree in cells grown on left rather than right ventricular dECM (Fig. 6A).

2.3.3. Cell activity

To evaluate the electromechanical functional activity of both stem/progenitor cells and cardiomyocytes exposed to dECM, we cultured hCPCs, MSCs, H9c2 cells, and HL-1 cardiomyocytes on left ventricular dECM or gelatin for 21 days. Then, we performed optical mapping to evaluate Ca^{2+} signaling and wave propagation. HL-1 cells, which had appeared to organize into muscle-like fibers in dECM, expressed connexin 43 in vitro (Fig. 6B,C). These cells could propagate action potentials and showed intracellular calcium transients in response to electrical pacing (Fig. 6D,E and Video 8). In contrast, hCPCs and hMSCs, which had failed to organize on the matrix, did not generate intracellular calcium transients or

propagate an electrical signal.

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.056>.

3. Discussion

The ability to engineer a complex organ such as the heart has been limited by the challenges involved in generating a thick vascularizable, scaffold that supports cardiomyocyte survival and maturation in 3-D and that replicates native organ function. In the present study, we have taken the first step toward the manufacture of a human heart graft. Specifically, we have applied perfusion decellularization for the first time to a complex human organ—the heart—to yield a structurally intact cytocompatibility dECM with preserved gross and fine structures and ECM, anisotropic cardiac mechanical properties, patent macro and microvasculature, and competent valves.

We have previously developed a process for chemically

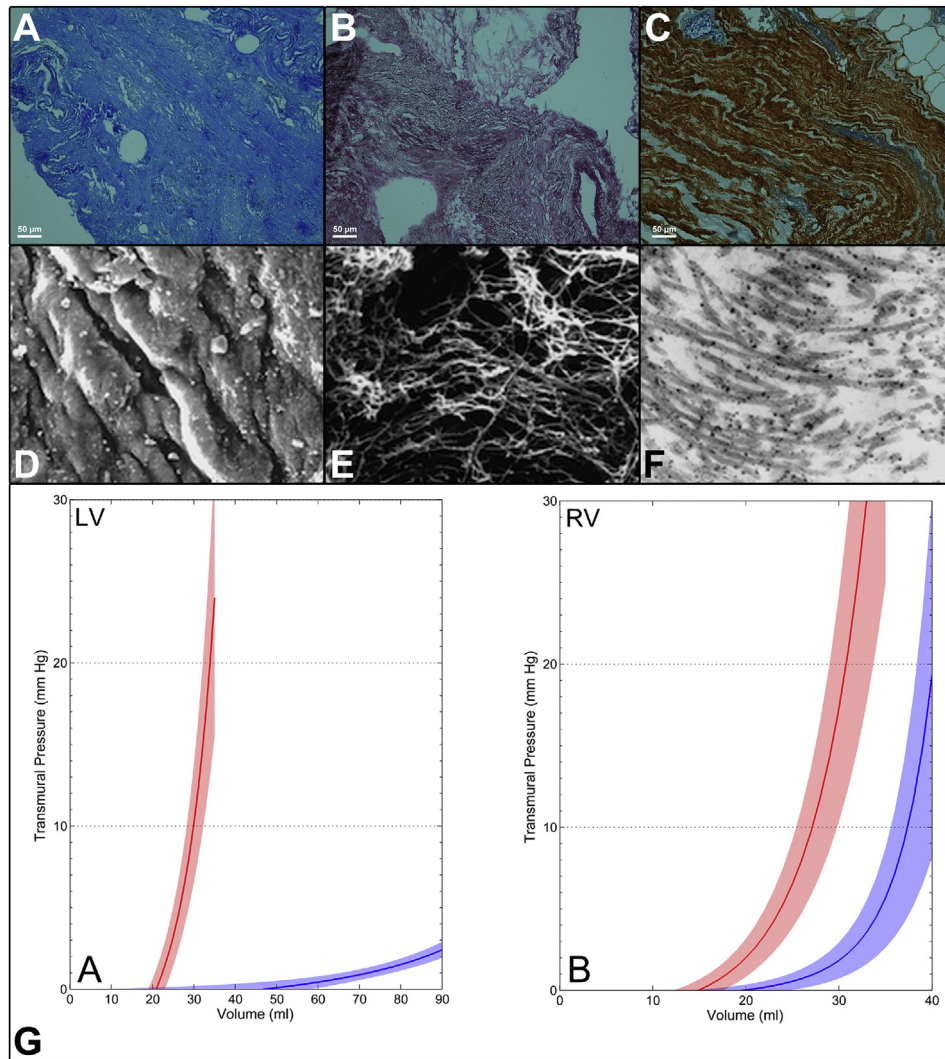


Fig. 3. Ultrastructure and mechanical analyses demonstrating retention of structure/function Masson's trichrome (Panel A), silver solution (Panel B), and collagen IV immunostaining (Panel C) of the dECM indicated retention of structural and basement membrane components (collagen, fibronectin, and laminin). Scanning electron micrographs of the interventricular septum showed the presence of myofibers (2,000 \times) in a non-decellularized control sample (Panel D) and the preservation of collagen and elastin fibers (2,500 \times) with the removal of cells throughout the tissue (Panel E) in a decellularized sample. Transmission electron micrograph (Panel F) of a decellularized interventricular septum sample, confirming the absence of cellular components and the retention of collagen and elastin fibers (25,000 \times). Average fitting curve of pressure volume data from left (Panel G[A]) and right (Panel G[B]) ventricles before (red curves) and after (blue curves) decellularization. Values are depicted as mean (solid line) \pm standard error of the mean (light ribbon).

decellularizing the heart to generate a scaffold [9], which has been extended to other organs, including liver, lung and kidney [13,14]. These scaffolds improve upon traditional tissue-engineering products by retaining 3-D organ macro and microstructure and an intact (although decellularized) vascular tree through which cells can be delivered and the nascent organ fed. Furthermore, this matrix appears to self-assemble seeded cells to yield constructs capable of organ function [13,14].

Macchiarelli and colleagues [15] used decellularization to generate a human trachea matrix—a simple tube—that was repopulated with human cells and successfully transplanted in a cancer patient who had no other therapeutic alternative. This first-in-human use of a recellularized matrix demonstrated the feasibility of this process for simple tubular structures and laid the foundation for applying this process to more complex organs.

The native ECM plays a pivotal role in organ structure and function by mediating physical, molecular and chemical signals and spatial organization. The cardiac ECM comprises primarily multiple

collagen isoforms, elastin, laminin, fibronectin, glycosaminoglycans, and a variety of growth factors. These molecules are arranged in a unique, tissue-specific, 3-D ultrastructure and are ideally organized within the tissue or organ from which the extracellular matrix is harvested. For example, ECM from the lung may be the preferred, or even necessary, substrate for respiratory epithelial cells [16]. The structure and composition of the ECM is constantly changing in response to the metabolic activity of the resident cell population, the mechanical demands of the tissue, and the prevailing conditions of the microenvironmental niche. This concept of “dynamic reciprocity” between the ECM and the resident cell populations strongly suggests that human ECM may have significant advantages over xenogenic matrices or synthetic materials and emphasizes the importance of maintaining the native composition and ultrastructure during the preparation of 3-D scaffolds [17]. In this study, we showed that human dECM could support cardiac stem and progenitor cell growth in vitro and could organize mature parenchymal and vascular cells into appropriate

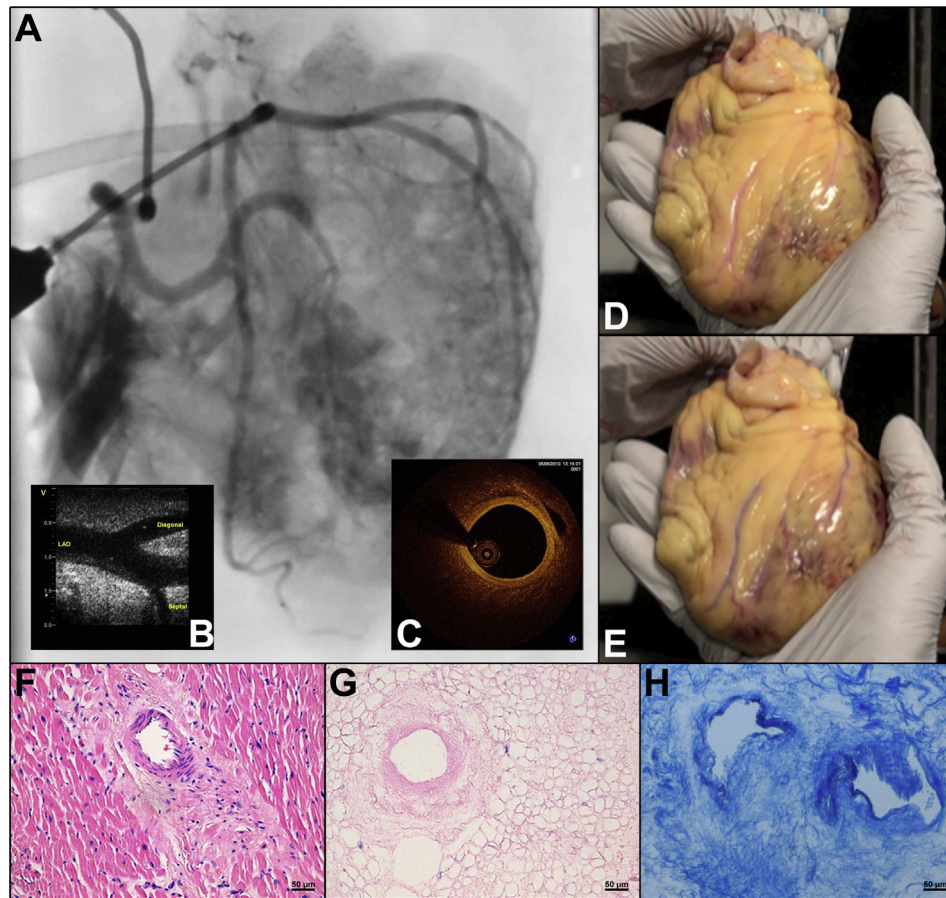


Fig. 4. Vascular studies of the decellularized heart matrix. Coronary angiography (Panel A) of the decellularized matrix showing preserved epicardial and myocardial vascular bed. Epicardial echocardiography (Panel B) showing integrity of left anterior descending artery (LAD), diagonal and septal branches. Optical coherence tomography (OCT) of the LAD (Panel C) showing preserved artery layers. Perfusion of the left coronary artery (Panels D and E) with human blood visualizing epicardial flow and blood perfusion of the left anterior wall. Hematoxylin and eosin-stained sections (20 \times) showing a non-decellularized sample of an intramyocardial microvascular artery (Panel F) compared with a decellularized sample (Panels G). Small-diameter decellularized arterial and venal conduits (Panel H) as seen with Masson's trichrome stain (20 \times).

tissue compartments. H9 and HL1 cardiomyocytes seeded on this matrix coalesced over time into nascent cardiac muscle fibers that were electrically and mechanically coupled but did not distribute in the vasculature, whereas endothelial cells were found lining the vascular conduits but were not randomly distributed in the parenchyma. The pivotal role of the ECM was also shown in the effect of the left versus right ventricular human dECM matrix on human adult stem cell differentiation after 21 days in culture. Although hCPCs seeded on either ventricular substrate demonstrated an enhanced expression of several cardiac markers including *bMHC*, *MEF2C*, *Nkx2.5* and *TnnT*, higher gene expression was seen when hCPCs were cultured on left compared to the right ventricle. Differences in mechanical strength, composition, growth factor distribution, or 3D ventricular architecture between the ventricular dECM may play a role in these disparate findings [18].

The choice of cell type for cardiac tissue recellularization is important. The best candidate cells are those that can easily and reproducibly be isolated, expanded in vitro, seeded onto/into decellularized scaffolds, induced to differentiate into appropriate lineage cells, and survive to functional maturity. To the best of our knowledge, this study is the longest and broadest analysis of different stem cells or cardiomyocytes after human dECM tissue recellularization. Although human liver and lung scaffolds seeded with induced pluripotent stem cells have been transplanted [19,20], the focus of those studies was short-term functionality, and no cell type comparisons were reported. Likewise, when human

MSCs, CPCs or HUVECs were studied on dECM decellularized myocardium, decellularized pericardium, or decellularized valve, only single cell types were evaluated [21–23]. Based on our current findings, localized, regional, and organ specific cues may be present in dECM. Thus, our human dECM model may be a useful tool in studies of cell–matrix interactions to help determine the biochemical cues that regulate the properties of primitive cardiac cells and guide cardiac tissue regeneration.

Recently, it has been shown that increasing mechanical strain can alter stem cell lineage commitment and maturation [24,25]. To our knowledge, the passive mechanical properties of whole human heart ECM have not been reported. The first study to provide insight into the relationship between the ECM structure and mechanical properties of the myocardium was performed by using isolated arrested rat hearts perfused with collagenase in which medium-sized collagen fibers were damaged [26]. These experiments showed that collagen determines the load configuration of the left ventricle but does not affect passive ventricular stiffness. Similar results were described in studies of the effect of the removal of the visceral pericardium on the PV relationship in resting pig hearts [27]. However, neither of these studies accounted for whole heart ECM and its interactions but instead extrapolated from measuring the properties of a small extent of the contribution of collagen network. Moreover, other than in our original manuscript [9] and our follow-up studies [28], right ventricular data have not been reported. In the present study, we demonstrate the feasibility of

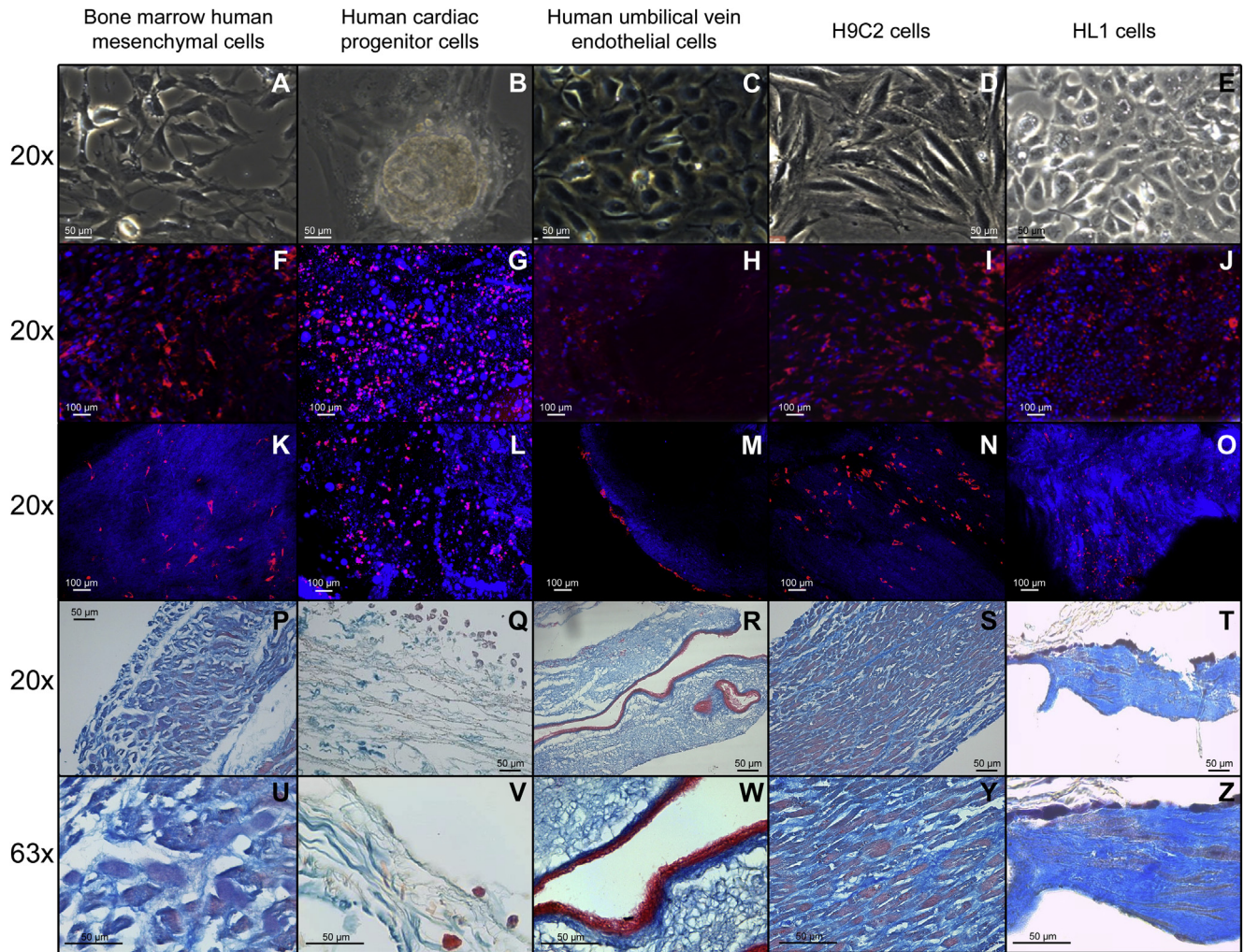


Fig. 5. Cytocompatibility of decellularized matrices: cell alignment and distribution Images of the following cell cultures: human bone marrow–derived mesenchymal cells (Panel A), human cardiac progenitor cells (Panel B), human umbilical vein endothelial cells (Panel C), H9c2 cells (Panel D), and HL-1 cells (Panel E). Cells stained with Dil (red) and DAPI (blue) seeded on top of a decellularized section of human left ventricular tissue assessed via laser-scanning confocal microscopy at 5 days (Panels F to J) and at 21 days (Panels K to O). Masson's trichrome staining at 21 days showing collagen (blue) fibers on a decellularized left ventricle patch as well as distribution of cells: bone marrow–derived mesenchymal cells infiltrating in the matrix with evidence of enlargement but uncompleted cell alignment (Panel P and U); human cardiac progenitor cells on the surface of the patch and rarely infiltrating in the matrix with no evidence of changes in cell appearance (Panels Q and V); human endothelial cells localized primarily within large-diameter cardiac vessels (Panels R and W); and H9c2 and HL1 cells attached to the matrix and adopting the anatomical alignment of human cardiomyocytes (Panels S, Y and T, Z respectively).

obtaining *ex vivo* physiological measurements of the human heart before and after decellularization. Remarkably, passive mechanical data from our experiments are similar to end-diastolic measurements reported in the literature obtained from studies conducted *in vivo* in beating hearts during complex acute preload interventions [29]. Because the 3-D organ architecture is preserved, we believe that our methodology accounts for the relative contribution of intra and extracellular compartments on global chamber properties. Interestingly, our findings show that the left and right ventricle matrices have a similar stiffness. Further studies before and after decellularization and recellularization are needed to identify the role of cells in this assessment. Nevertheless, our data suggest that specific assessment of PV data can provide valuable insight into whole heart cardiac mechanics.

Finally, previous studies on synthetic scaffolds and acellular ECMs have demonstrated that seeded cardiomyocytes contract as a response to electrical stimulation [9,30,31]. Here, we show for the first time that HL-1 cardiomyocytes seeded onto human ECM exhibit calcium dynamics and impulse propagation, which suggest

that they form functional intercellular connections. Although the conduction velocity was lower than that seen in the human native myocardium, electromechanical stimulation of seeded cardiac patches may allow for increased conduction velocities and more mature calcium dynamics [30].

4. Conclusions

Our data demonstrate that decellularization of cadaveric whole human hearts is feasible. dECM provides a cytocompatible scaffold with intract 3-Dimensional architecture and a preserved vascular network that can promote cardiocyte gene expression in stem cells and organize existing cardiomyocytes into nascent muscle showing electrical coupling.

Funding sources

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (PLE2009-0152, PLE2009-147 and

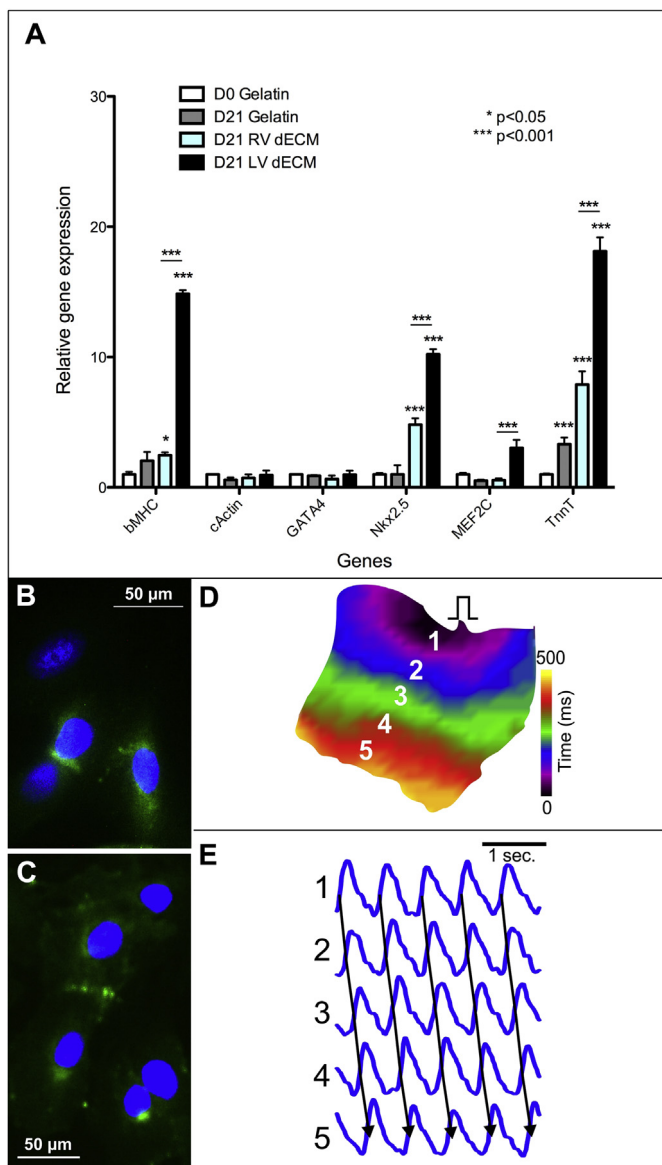


Fig. 6. Cell differentiation and electrical activity. Cardiomyocyte marker expression in human cardiac progenitor cells grown for 21 days on decellularized human right and left ventricles or in 0.1% gelatin-coated plates (2D) for 0 or 21 days (Panel A). HL-1 cells expressing connexin 43 in vitro (Panels B and C, respectively). Illustration of calcium propagation on recellularized cardiac slices with HL-1 cardiomyocytes; isochronal map of calcium transient propagation (Panel D) and calcium transient of a representative pixel (3) of panel D (Panel E). HL-1 cells propagated the electrical activity from the pacing point to the other regions of the matrix.

PLE2009-109) and the Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Economy and Competitiveness, Spain: PI10-00141 and PI10-02038), Red de Investigación Cardiovascular (RIC) and Red de Terapia Celular (TerCel) from Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Economy and Competitiveness, Spain) and Comunidad Autónoma de Madrid (CAM: S2010/BMD-2420). Salvatore Costanza was supported by PI10-00141; Andreu Martínez Climent and M^a Ángeles González de Nicolás were supported by PLE2009-0152; and Judith R Acebes was supported by PLE2009-0109.

Acknowledgments

We specially thank Ana Fernández Baza for her logistic coordination. Jesus Romero and rest of the Unidad de Fotografía staff of

the Hospital General Universitario Gregorio Marañón for their help in editing Figures and Videos. Julio García for his help and development with histology techniques. Judith R Acebes for her help with DNA quantification. We also thank the all the medical, nursing staff, and personnel in the Hospital General Universitario Gregorio Marañón, the University of Minnesota, the Texas Heart Institute, and the ONT who made the study possible. Most of all, we thank all the relatives of each donor patient for donating specifically the hearts to be used for this investigational purpose; without their help science would never advance.

References

- [1] E. Arias, United States life tables, 2009, Natl. Vital Stat. Rep. 62 (7) (2014) 1–63.
- [2] D. Mozaffarian, E.J. Benjamin, A.S. Go, D.K. Arnett, M.J. Blaha, M. Cushman, S. de Ferranti, J.P. Despres, H.J. Fullerton, V.J. Howard, et al., Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association, *Circulation* 131 (4) (2015) e29–322.
- [3] L.W. Stevenson, The urgent priority for transplantation is to trim the waiting list, *J. Heart Lung Transpl.* 32 (9) (2013) 861–867.
- [4] M.R. Johnson, K.H. Meyer, J. Haft, D. Kinder, S.A. Webber, D.B. Dyke, Heart transplantation in the United States, 1999–2008. *American journal of transplantation*, Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. 10 (4 Pt 2) (2010) 1035–1046.
- [5] F. Gonzalez-Vilchez, M. Gomez-Bueno, L. Almenar, M.G. Crespo-Leiro, J.M. Arizon, J. Palomo, J. Delgado, E. Roig, E. Lage, N. Manito, et al., Spanish Heart Transplantation Registry. 25th official report of the Spanish Society of Cardiology Working Group on Heart Failure and Heart Transplantation (1984–2013), *Revista española de cardiología* 67 (12) (2014) 1039–1051.
- [6] M.Y. Emmert, R.W. Hitchcock, S.P. Hoerstrup, Cell therapy, 3D culture systems and tissue engineering for cardiac regeneration, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69–70 (2014) 254–269.
- [7] D.M. Nelson, Z. Ma, K.L. Fujimoto, R. Hashizume, W.R. Wagner, Intramyocardial biomaterial injection therapy in the treatment of heart failure: Materials, outcomes and challenges, *Acta Biomater.* 7 (1) (2010) 1–15.
- [8] J.M. Singelyn, K.L. Christman, Injectable Materials for the Treatment of Myocardial Infarction and Heart Failure: The Promise of Decellularized Matrices, *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 3 (5) (2010) 478–486.
- [9] H.C. Ott, T.S. Matthiesen, S.K. Goh, L.D. Black, S.M. Kren, T.I. Netoff, D.A. Taylor, Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bio-artificial heart, *Nat. Med.* 14 (2) (2008) 213–221.
- [10] E. Messina, L. De Angelis, G. Frati, S. Morrone, S. Chimenti, F. Fiordaliso, M. Salio, M. Battaglia, M.V. Latronico, M. Coletta, et al., Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart, *Circ. Res.* 95 (9) (2004) 911–921.
- [11] P.L. Sanchez, J.A. San Roman, A. Villa, M.E. Fernandez, Fernandez-Aviles F: Contemplating the bright future of stem cell therapy for cardiovascular disease, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3 (Suppl 1) (2006) S138–S151.
- [12] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials* 32 (12) (2011) 3233–3243.
- [13] S.F. Badylak, D. Taylor, K. Uygun, Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 13 (2011) 27–53.
- [14] J.E. Arenas-Herrera, I.K. Ko, A. Atala, J.J. Yoo, Decellularization for whole organ bioengineering, *Biomed. Mater.* 8 (1) (2013) 014106.
- [15] A. Gonfotti, M.O. Jaus, D. Barale, S. Baiguera, C. Comin, F. Lavarini, G. Fontana, O. Sibila, G. Rombola, P. Jungebluth, et al., The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results, *Lancet* 383 (9913) (2014) 238–244.
- [16] Y.M. Lin, A. Zhang, H.J. Rippon, A. Bismarck, A.E. Bishop, Tissue engineering of lung: the effect of extracellular matrix on the differentiation of embryonic stem cells to pneumocytes, *Tissue Eng. Part A* 16 (5) (2010) 1515–1526.
- [17] K. Schenke-Layland, O. Vasilevski, F. Opitz, K. König, I. Riemann, K.J. Halhuber, T. Wahlers, U.A. Stock, Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves, *J. Struct. Biol.* 143 (3) (2003) 201–208.
- [18] G.C. Reilly, A.J. Engler, Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation, *J. Biomech.* 43 (1) (2010) 55–62.
- [19] T. Takebe, K. Sekine, M. Enomura, H. Koike, M. Kimura, T. Ogaeri, R.R. Zhang, Y. Ueno, Y.W. Zheng, N. Koike, et al., Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant, *Nature* 499 (7459) (2013) 481–484.
- [20] M. Ghaedi, E.A. Calle, J.J. Mendez, A.L. Gard, J. Balestrini, A. Booth, P.F. Bove, L. Gui, E.S. White, L.E. Niklason, Human iPSC cell-derived alveolar epithelium repopulates lung extracellular matrix, *J. Clin. Invest.* 123 (11) (2013) 4950–4962.
- [21] S. Rajabi-Zeleti, S. Jalili-Firoozinezhad, M. Azarnia, F. Khayyatani, S. Vahdat, S. Nikeghbalian, A. Khademhosseini, H. Baharvand, N. Aghdami, The behavior of cardiac progenitor cells on macroporous pericardium-derived scaffolds, *Biomaterials* 35 (3) (2014) 970–982.
- [22] A. Weymann, B. Schmack, T. Okada, P. Soos, R. Istok, T. Radovits, B. Straub,

- E. Barnucz, S. Loganathan, I. Patzold, et al., Reendothelialization of human heart valve neoscaffolds using umbilical cord-derived endothelial cells. *Circulation journal, Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 77 (1) (2013) 207–216.
- [23] L. Dainese, A. Guarino, I. Burba, G. Esposito, G. Pompilio, G. Polvani, A. Rossini, Heart valve engineering: decellularized aortic homograft seeded with human cardiac stromal cells, *J. Heart Valve Dis.* 21 (1) (2012) 125–134.
- [24] L.R. Geuss, L.J. Suggs, Making cardiomyocytes: How mechanical stimulation can influence differentiation of pluripotent stem cells, *Biotechnol. Prog.* 29 (5) (2013) 1089–1096.
- [25] B. Wang, G. Wang, F. To, J.R. Butler, A. Claude, R.M. McLaughlin, L.N. Williams, A.L. de Jongh, Curry, J. Liao, Myocardial scaffold-based cardiac tissue engineering: application of coordinated mechanical and electrical stimulations, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 29 (35) (2013) 11109–11117.
- [26] D.A. MacKenna, J.H. Omens, A.D. McCulloch, J.W. Covell, Contribution of collagen matrix to passive left ventricular mechanics in isolated rat hearts, *Am. J. Physiol.* 266 (3 Pt 2) (1994) H1007–H1018.
- [27] P.D. Jobsis, H. Ashikaga, H. Wen, E.C. Rothstein, K.A. Horvath, E.R. McVeigh, R.S. Balaban, The visceral pericardium: macromolecular structure and contribution to passive mechanical properties of the left ventricle, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293 (6) (2007) H3379–H3387.
- [28] C. Witzenburg, R. Raghupathy, S.M. Kren, D.A. Taylor, V.H. Barocas, Mechanical changes in the rat right ventricle with decellularization, *J. Biomech.* 45 (5) (2012) 842–849.
- [29] D. Burkhoff, I. Mirsky, H. Suga, Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289 (2) (2005) H501–H512.
- [30] M. Radisic, V.G. Fast, O.F. Sharifov, R.K. Iyer, H. Park, G. Vunjak-Novakovic, Optical mapping of impulse propagation in engineered cardiac tissue, *Tissue Eng. Part A* 15 (4) (2009) 851–860.
- [31] K.R. Stevens, K.L. Kreutziger, S.K. Dupras, F.S. Korte, M. Regnier, V. Muskheli, M.B. Nourse, K. Bendixen, H. Reinecke, C.E. Murry, Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (39) (2009) 16568–16573.